

Aus dem Ludwig-Aschoff-Haus,
dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
Direktor: Professor Dr. F. Büchner

Die Veränderungen des
Eiweiß-Ribonucleinsäure-Stoffwechsels
der Leberepithelzelle während der
experimentellen Cancerisierung
durch Diäthylnitrosamin

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
JÖRG HARTJE

aus Berlin

1963

Dekan: Professor Dr. H. Wimböfer
Referent: Dozent Dr. W. Oehlert

Die Veränderungen des Eiweiß-Ribonucleinsäure-Stoffwechsels der Leberepithelzelle während der experimentellen Cancerisierung durch Diäthylnitrosamin*

Von

W. Oehlert und J. Hartje**

Aus dem Ludwig-Aschoff-Haus,
dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.
Direktor: Prof. Dr. F. BÜCHNER

Mit 17 Abbildungen und 3 Tabellen im Text

(Eingegangen am 4. März 1963)



* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Diss.-Arbeit J. HARTJE.

Diäthylnitrosamin (DAENA) führt bei täglicher Verfütterung kleiner Mengen (5 mg/kg/Tag) innerhalb von 120–150 Tagen bei der Ratte zur Entstehung vorwiegend hepatozellulärer Carcinome (SCHMÄHL, PREUSSMANN und HAMPERL 1960; HAMPERL 1960; THOMAS 1961; ARGUS 1961; GRUNDMANN und SIEBURG 1962). Während der Zeit, welche dem Auftreten der Carcinome vorangeht, wurden Veränderungen am Leberparenchym beschrieben, die in denjenigen Läppchenabschnitten ihr größtes Ausmaß erreichen, in denen später die Carcinome zur Entwicklung kommen (GRUNDMANN und SIEBURG 1962). Diese cytologischen Veränderungen bestehen vor allem in Vakuolisierungen des Cytoplasmas und in Kern- und Nucleolenvergrößerungen der Leberzellkerne (HAMPERL 1960; GRUNDMANN und SIEBURG 1962). Außerdem konnten durch cytophotometrische Untersuchungen Änderungen im cytoplasmatischen Ribonucleoproteidgehalt (HOBIG und GRUNDMANN 1962) und elektronenmikroskopisch Abbau der Ergastoplasmamembranen und der Ribosomen und deren Ersatz durch ein vesikuläres endoplasmatisches Reticulum beobachtet werden (MÖBERT, HILL und BÜCHNER 1962). Durch autoradiographische Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß der Ribonucleoproteinverarmung

und dem Abbau des Ergastoplasmas und der Ribosomen in läppchenzentral gelegenen Leberepithelien eine Zunahme der DNS-Neubildung parallel geht (COTÉ, OEHLERT und BÜCHNER 1962).

Die Versuche, über deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit berichtet wird, setzen sich zum Ziel, Aufschlüsse über die relative Größe der Ribonucleinsäure- und der Proteinneubildung in der Leber während der Cancerisierung und im voll ausgebildeten Carcinom zu erhalten. Dabei soll vor allem untersucht werden, welche Veränderungen im RNS- und Eiweiß-(EW-)Stoffwechsel den bereits bekannten Zell- und Gewebsveränderungen zugrunde liegen.

Versuchsanordnung und Methodik

150 g schwere männliche Albinoratten erhielten täglich 0,75 mg Diäthylnitrosamin (DAENA) = 5 mg/kg/Tag mit dem Trinkwasser in Form einer 0,0075 %igen, wäßrigen Lösung. Die Ernährung erfolgte durch Altromin-Trockenfutter.

15, 45, 65, 95, 120, 135, 150 und 162 Tage nach Versuchsbeginn wurden jeweils 2 Tiere histologisch untersucht. Eines der beiden Tiere erhielt 60 Minuten vor der Dekapitation 1 mC ^3H -Cytidin (spezifische Aktivität: 1,0 C/mMol), das andere 45 Minuten vor der Dekapitation 1 mC ^3H -d,l-Leucin (spezifische Aktivität: 3,0 C/mMol) durch intraperitoneale Injektion. Von den sofort entnommenen Lebern wurden kleine Stücke nach Fixation in gepuffertem neutralem Formalin (^3H -Cytidin) bzw. Formalin-Trichloressigsäure-Gemisch (^3H -d,l-Leucin) über Methylbenzoat und Benzol in Paraffin eingebettet. Außerdem wurden in gleicher Weise die Lebern von 4 Kontrolltieren für den Cytidinversuch und von einem Kontrolltier für den Leucinversuch aufgearbeitet. Zusätzlich wurden von allen Tieren Gewebsstückchen von der Zunge eingebettet. Von 5 μ dicken Gewebsschnitten wurden Autoradiogramme hergestellt. Dabei wurden die entparaffinierten Schnitte durch Eintauchen mit flüssiger Emulsion überzogen. In einer besonderen Versuchsserie wurden Schnitte von der Leber und der Zunge jeweils eines Versuchstieres auf einem Objektträger gemeinsam aufgezogen und mit Emulsion überschichtet. Zur Verwendung kamen flüssige Emulsionen in Gelform der Firma Ilford: G₅ und K₂. Die Expositionszeiten betrugen 17–28 Tage für K₂-Autoradiogramme und 7–10 Tage für G₅-Präparate. Alle Schnitte wurden durch die Filmschicht hindurch mit Hämatoxylin-Eosin, Leerschnitte nach VAN GIESON und Kresylviolett, Gefrierschnitte mit Hämatoxylin-Sudan angefärbt.

Quantitative Auswertung der Autoradiogramme

a) ^3H -Cytidin

Um neben rein qualitativen Aussagen über Einbauort und Einbaumuster von ^3H -Cytidin auch quantitative Aussagen über relative Einbaugrößen zu erhalten, erfolgten bei den verschiedenen Versuchszeiten Aktivitätsmessungen durch Silberkornauszählungen. Hierbei kam es einmal darauf an, Aussagen über die Einbauverhältnisse in läppchenzentralen und läppchenperipheren Parenchymbezirken zu erhalten und zweitens Hinweise dafür zu erlangen, ob mit zunehmender Versuchszeit eine Veränderung der Einbauaktivität in der Leber der behandelten Tiere eintritt.

Da bei der von uns gewählten Versuchszeit von 60 Minuten zwischen Injektion von ^3H -Cytidin und Tötung des Tieres die autoradiographisch nachweisbare ^3H -Cytidin-Aktivität vorwiegend auf den Kern beschränkt ist, wurden die Silberkörner über den Zellkernen, getrennt nach zentralen und peripheren Leberepithelien, ausgezählt. Gleichzeitig wurden planimetrisch die Flächen der ausgezählten Kerne bestimmt, um den Aktivitätseinbau pro Kernfläche (Silberkornzahl: Kernfläche = Silberkorndichte) ermitteln zu können. Die Silberkorndichten sind Mittelwerte aus 150 Läppchenzentralen und gleichviel peripheren Einzelmessungen je Tier.

In einer weiteren Auswertungsreihe wurden Silberkornzahlen und Silberkorndichten über 200 zentral gelegenen Leberzellkernen und über 100 Kernen des Stratum spinosum des mehrschichtigen Plattenepithels der Zunge ein und desselben Versuchstieres nach gleicher Behandlung auf demselben Objektträger ermittelt. Die für das Zungenepithel gefundenen mittleren Silberkorndichten wurden dann = 1 und die entsprechenden Werte für die Leberepithelien dazu in Beziehung gesetzt. Auf diese Weise erhielten wir Vergleichswerte, die unabhängig von unterschiedlichen Resorptionsverhältnissen und Aktivitätsdosen von Tier zu Tier vergleichbar waren und die Anhaltspunkte über den zeitlichen Verlauf der Einbaugrößen lieferten.

Die ermittelten Silberkornzahlen, Silberkorndichten und die planimetrisch ermittelten relativen Kernflächen wurden in Tabelle 1, 2 und 3 für die verschiedenen Versuchszeiten zusammengefaßt und in Abbildung 1 und 2 graphisch aufgetragen. Die in Tabelle 3 eingetragenen Verhältniswerte zwischen zentral und peripher ermittelten Silberkorndichten sind in Abbildung 1 als schwarze Säulen dargestellt, welche den Unterschied zwischen den beiden Silberkorndichten desselben Tieres unabhängig von den absoluten Zahlenwerten angeben. Tabelle und Abbildung 2 geben die relative Silberkorndichte zentraler Leberparenchymkerne im Vergleich zu der relativen Silberkorndichte des Zungenepithels desselben Tieres an und damit vergleichbare relative Größen für die ^3H -Cytidin-Aktivität pro Flächeneinheit bei den einzelnen Versuchszeiten.

b) ^3H -Leucin

Unter Benutzung eines Planquadrates und durch Silberkornauszählungen haben wir die mittleren Silberkorndichten unabhängig von Kern und Cytoplasma zentraler und peripherer Läppchenabschnitte der Leber im Vergleich zum mehrschichtigen Plattenepithel der Zunge bei den verschiedenen Versuchszeiten bestimmt. In gleicher Weise wie bei ^3H -Cytidin wurden die Werte als Verhältnisse ermittelt. Dabei stießen wir auf die bei allen quantitativen Auswertungen unter Zugrundelegen von willkürlichen Flächeneinheiten für das Cytoplasma grundsätzlich vorhandene Schwierigkeit, daß die Zellen innerhalb der Leberläppchen nicht einheitlich sind und im Verlaufe der Cancerisierung besonders zentral durch vakuolige Veränderungen des Cytoplasmas stark anschwellen. Diese Uneinheitlichkeit der Zellen hinsichtlich ihrer Größe, der Cytoplasmastruktur und -dichte macht es für quantitative Angaben erforderlich, immer ganze Zellen auszuwerten und die gewonnenen Ergebnisse auf Einzelzellen zu beziehen. Da eine genaue Abgrenzung der Leberparenchymzellen bei unseren Färbungen nicht sicher genug möglich war, können wir unsere Werte nur als grobe Annäherung auffassen und wollen deshalb nur von Zunahme bzw. Abnahme von Silberkorndichten sprechen.

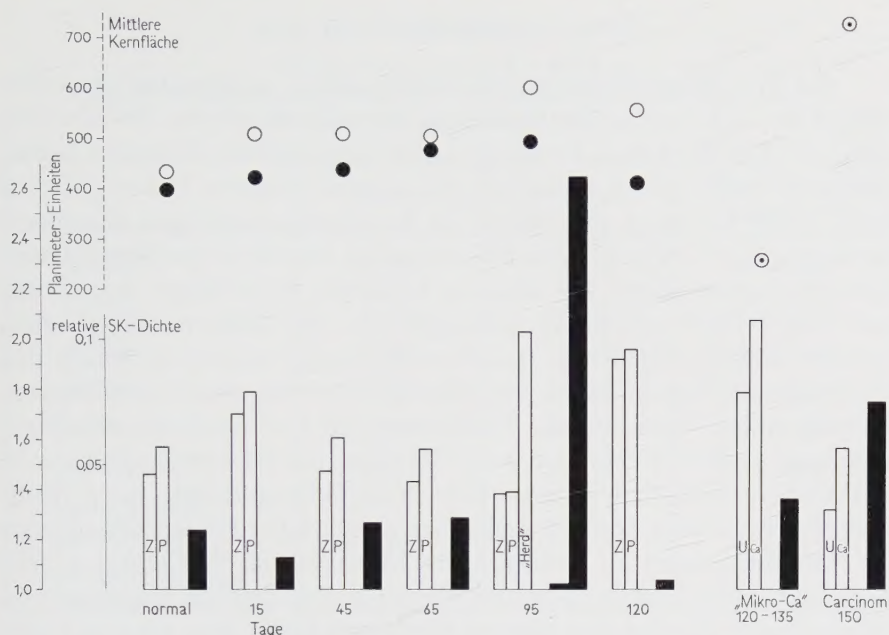


Abb. 1. Oben: Mittlere Kernflächen in relativen Planimeteereinheiten. o = zentral, ● = peripher, ⊙ = „Mikrocarcinom“ und Carcinom (vgl. Tab. 1).

Unten: Relative Silberkorndichten läppchenzentral (z) und läppchenperipher (p) (helle Säulen). Schwarze Säulen = Verhältnis der 2 unterschiedlichen Silberkorndichten im Leberläppchen desselben Tieres unabhängig von den absoluten Zahlenwerten (vgl. Tab. 3).

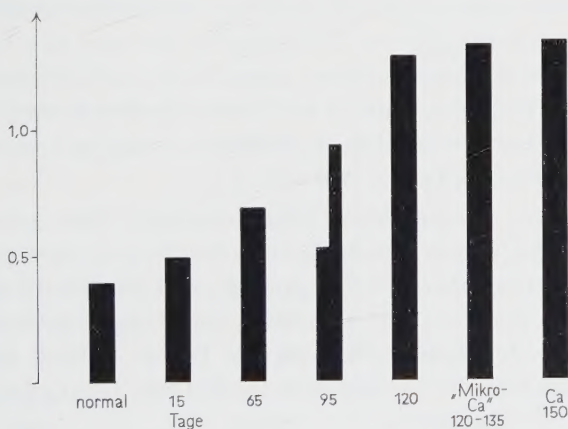


Abb. 2. Verhältniswerte zwischen der relativen Silberkorndichte zentraler Leberparenchymkerne und der relativen Silberkorndichte des Zungenepithels desselben Tieres (vgl. Tab. 2). Zunahme der relativen Größe der RNS-Neubildung mit steigender Versuchszeit.

Beschreibung der Ergebnisse

Bei allen Kontrolltieren wurde histologisch ein regelrechter Läppchenaufbau der Leber gefunden. Bereits bei der mikroskopischen Betrachtung fällt auf, daß die Kerne der in der Läppchenperipherie liegenden Leberepithelien meist etwas kleiner als die zentral gelegener Leberepithelien sind. Dieser Eindruck wird durch die Kernflächenmessungen signifikant bestätigt (Tab. 1, Abb. 1). Sowohl in zentralen als auch in peripheren Läppchenabschnitten liegen vor allem in Kernnähe in scholliger Anordnung mit Kresylviolett anfärbbare Nucleoproteide. Die Zellkerne zeigen einen, seltener mehrere Nucleolen. Das Kernchromatin umgibt als Schale den Nucleolus und liegt in Fäden oder Schollen über den gesamten Kernraum verteilt, wobei vereinzelt eine Verdichtung an der Innenseite der Kernmembran besteht. 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin findet man praktisch ausschließlich über den Kernen der Leberepithelien, der v. Kupferschen Sternzellen und der Zellen der periportalen Felder Silberkörner im Autoradiogramm als Ausdruck des Einbaues von ^3H -Cytidin in fällbare RNS. Meist besteht über dem Nucleolus eine dichtere Lagerung von Silberkörnern als über dem übrigen Kern, doch findet man auch hier über einzelnen Chromatinschollen zusammenliegende Silberkörner (Abb. 17a). Durch diese Silberkornanordnung unterscheiden sich die Autoradiogramme nach Injektion von ^3H -Cytidin von denen, die man nach Injektion von ^3H -Thymidin erhält. Hierbei liegen in nur wenigen Zellkernen diffus über den Kernraum verteilte Silberkörner im Autoradiogramm, wobei bei entsprechender Schnittdicke der Nucleolus ausgespart bleibt. Bereits bei der oberflächlichen Betrachtung hat man den Eindruck, daß die Silberkorndichte über peripher liegenden Leberzellkernen größer als über denen der Läppchenzentren ist. Dieser Eindruck wird durch Silberkornzählungen und gleichzeitige Kernflächenmessungen bestätigt und ist statistisch signifikant (Tab. 3, Abb. 1).

Ein Vergleich der mittleren Silberkorndichte über zentralen Leberzellkernen mit derjenigen von Zellkernen des Stratum spinosum im mehrschichtigen Plattenepithel der Zunge zeigt, daß die Silberkorndichte über den Zellkernen des Stratum spinosum des Zungenepithels etwa 3mal größer als über den Leberzellkernen ist. Dieser Befund entspricht den Meßergebnissen anderer Untersucher (SCHULTZE, OEHLERT und MAURER 1961).

45 Minuten nach Injektion von ^3H -d, l-Leucin findet man im Autoradiogramm der Leber sowohl über dem Cytoplasma als auch über dem Zellkern Silberkörner in diffuser Verteilung. Stellenweise erscheinen die

Tabelle 1

Tabelle der mittleren Kernflächen
aus je 150 läppchenzentralen und 150 peripheren Kernen in relativen
Planimetereinheiten (vgl. Abb. 1)

	Zentral	Peripher	Signifikanz des Unterschiedes
Normal	437,77	402,37	$P < 0,01$
15 Tage	511,92	425,77	$P < 0,001$
45 Tage	514,57	440,25	$P < 0,001$
65 Tage	507,41	482,24	$P < 0,1$
95 Tage	606,44	500,15	$P < 0,001$
120 Tage	564,64	419,16	$P < 0,001$
Mikrocarcinom			
120-135 Tage	263,21	—	—
Carcinom 150 Tage	735,99	—	—

Tabelle 2

Tabelle der mittleren Silberkorndichten zentraler Läppchenabschnitte der Leber (je 200 Kerne) und des Stratum spinosum des mehrschichtigen Plattenepithels der Zunge (je 100 Kerne) (vgl. Abb. 2)

	Silberkorndichte Leber	Silberkorndichte Zunge	Quotient Leber zu Zunge
Normal	0,0234	0,0598	0,392
15 Tage	0,0327	0,0665	0,491
65 Tage	0,0372	0,0543	0,686
95 Tage			
zentral	0,0310	0,0586	0,523
Herd	0,0549		0,938
120 Tage	0,1188	0,0920	1,291
Mikrocarcinom			
120-135 Tage	0,1225	0,0920	1,332
Infiltrierendes Carcinom 150 Tage	0,0817	0,0604	1,350

Tabelle 3

Tabelle der mittleren Silberkorndichten aus je 150 läppchenzentralen und 150 läppchenperipheren Leberepithelkernen in relativen Einheiten (vgl. Abb. 1)

		Mittlere SK-Dichte	Standard- abweichung σ	Signifikanz P	Verhältnis der SK-Dichten
Normal	Z	0,0467	0,0207	P < 0,001	1:1,24
	P	0,0579	0,0253		
15 Tage	Z	0,0708	0,0206	P < 0,001	1:1,13
	P	0,0798	0,0236		
45 Tage	Z	0,0482	0,0155	P < 0,001	1:1,27
	P	0,0613	0,0148		
65 Tage	Z	0,0441	0,0110	P < 0,001	1:1,29
	P	0,0569	0,0118		
95 Tage	Z	0,0384	0,0162	P < 0,60	1:1,025
	P	0,0393	0,0124	P < 0,001	1:2,66
	Herd	0,1045	0,0254		
120 Tage	Z	0,0914	0,0213	P < 0,02	1:1,045
	P	0,0976	0,0186		
120-135 Tage	Umgebung	0,0796	0,0272	P < 0,001	1:1,37
	Mikrocarcin.	0,1093	0,0253		
150 Tage	Umgebung	0,0327	0,0139	P < 0,001	1:1,76
	Carcinom	0,0575	0,0177		

innerhalb des Kernes auftretenden Silberkörner in der Umgebung des Nucleolus und im randständigen Chromatin verdichtet. Im Cytoplasma besteht oft eine Silberkornverdichtung über den basophilen Schollen in Kernnähe. Vergleicht man die Silberkorndichte zwischen Plattenepithel der Zunge und dem Lebergewebe ein und desselben Versuchstieres, so ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung der Silberkorndichten und damit der Größe des Aminosäureeinbaues.

15 Tage nach Versuchsbeginn sind Veränderungen des Gewebsaufbaues der Leber nicht nachweisbar. Sowohl bei dem Tier, welches eine Leucininjektion erhielt, als auch bei dem Cytidin-Tier findet man ohne eindeutige Bevorzugung bestimmter Läppchenabschnitte bei einzelnen Zellen – manchmal auch gruppiert – das Auftreten von optisch leeren, fettfreien Vakuolen im Cytoplasma, die fast regelmäßig als Aufhellungen und kleine Bläschen an der Kernmembran beginnen. Dabei wird das noch grobschollige Cytoplasma auseinander und nach der Zellmembran gedrängt. Vielfach umgeben Vakuolen halbmondförmig den Zellkern und bei fortgesetzter DAENA-Fütterung fließen derartige Vakuolen bei gleichzeitigem Verlust der basophilen Schollen zu einem

See zusammen, welcher den gesamten Kern umgeben kann. Die Kernflächenbestimmungen ergeben eine Zunahme der mittleren Kernfläche, die in zentralen Läppchenabschnitten deutlicher als in der Peripherie ausgeprägt ist (Tab. 4, Abb. 4).

In den Autoradiogrammen hat sich nach Injektion von ^3H -Cytidin die Silberkornverteilung gegenüber der Norm nicht wesentlich geändert. Die Silberkorndichte ist im Vergleich mit der des Zungenepithels gegenüber der Norm geringfügig angestiegen (Tab. 2, Abb. 2). Dementsprechend liegen innerhalb der Leberzellkerne die Silberkörner über dem Nucleolus und dem Chromatin dichter (Abb. 3, 17b). Nach Injektion von ^3H -Leucin findet man wie beim Kontrolltier Silberkörner über Kern und Cytoplasma in unveränderter Anordnung (Abb. 4). Ein Vergleich mit Autoradiogrammen vom Plattenepithel der Zunge zeigt, daß die Silberkornzahl pro Flächeneinheit gegenüber der unbehandelten Leber geringgradig abgenommen hat.

45 Tage nach Fütterungsbeginn ist der Läppchenaufbau der Leber weiterhin erhalten. Dagegen haben die vakuoligen Zellveränderungen erheblich zugenommen, sowohl hinsichtlich ihrer Ausdehnung über das gesamte Lebergewebe als auch hinsichtlich der Einzelzellveränderungen. Das Cytoplasma ist großblasig umgewandelt und geschwollen, der Kern liegt oft an die Zellmembran gedrängt oder zentral in einem Flüssigkeitssee, durch strang- oder netzförmige Cytoplasmabrücken mit dem randständigen Cytoplasma verbunden. Die basophilen Cytoplasmashollen sind weitgehend verschwunden. Die Zellkerne sind groß und hell, die Nucleolen vergrößert. Das Chromatin ist zum Teil an der Innenseite der Kernmembran verdichtet. Vereinzelt findet man Einzelzellnekrosen und doppelkernige Leberepithelien.

Nach Injektion von ^3H -Cytidin besteht im Autoradiogramm eine vermehrte Silberkornbelegung der vergrößerten Nucleolen und der randständigen Chromatinanteile. Das Verhältnis zwischen Silberkorndichte peripherer und zentraler Leberepithelien entspricht dem der normalen Leber (Tab. 3, Abb. 1).

Nach Injektion von ^3H -Leucin liegen die Silberkörner im Autoradiogramm vorwiegend über den Cytoplasmaanteilen, welche die mit eiweißarmer Flüssigkeit gefüllten Hohlräume umgeben. Im Zellkern entspricht die Silberkornverteilung dem Chromatinmuster. Die Nucleolen sind oft frei von Silberkörnern. Wegen der ungleichmäßigen Silberkornbelegung des Cytoplasmas infolge der Vakuolisierung und wegen der Volumenvergrößerung der Leberepithelien stößt der Silberkorndichtenvergleich zwischen Lebergewebe und Zungenepithel auf Schwierigkeiten. Dennoch hat man den Eindruck, daß gegenüber der Norm eine Abnahme der Einbauaktivität von ^3H -Leucin in der Leber besteht.

65 Tage nach Versuchsbeginn beobachtet man stellenweise eine Zunahme der cytoplasmatischen Basophilie in läppchenperipher gelegenen Leberepithelien. Die Anzahl von Einzelzellnekrosen hat in den Läppchenzentren zugenommen. Vereinzelt beobachtet man Mitosen. Das Silberkorndichtenverhältnis zwischen Läppchenperipherie und Läppchenzentrum ist gegenüber der Versuchszeit von 45 Tagen unverändert. Vereinzelt findet man Zellgruppen, in denen eine besonders starke Einwässerung des Cytoplasmas und auffallende Kernvergrößerungen bestehen. Die Nucleolen derartiger Zellkerne sind sehr dicht mit Silberkörnern belegt. In Übereinstimmung mit diesem histologischen Bild hat sich die mittlere Silberkorndichte im Vergleich zum Plattenepithel der Zunge gegenüber der Norm deutlich erhöht (Tab. 2, Abb. 2).

Die Autoradiogramme der Leber nach Injektion von ^3H -Leucin bieten das gleiche Bild wie bei der vorangehenden Versuchszeit.

Abb.
3Abb.
4

Abb. 3. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm des Lebergewebes 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin, 15. Tag der DAENA-Fütterung. Auftreten kernnaher fettfreier Vakuolen im Cytoplasma der Leberepithelien und Abnahme der cytoplasmatischen Basophilie. Einbau markierten Cytidins in die fällbare RNS des Zellkerns mit größerer Einbauaktivität des Nucleolus.

Abb. 4. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm des Lebergewebes 45 Minuten nach Injektion von ^3H -Leucin, 15. Tag der DAENA-Fütterung. Aminosäureeinbau in die Proteine des Kerns und des Cytoplasmas.

95 Tage nach Fütterungsbeginn bietet sich ein sehr wechselndes histologisches Bild in den Lebern der entsprechenden Versuchstiere. Man beobachtet jetzt in herdförmiger Verteilung Gruppen von Leberepithelien in Läppchenzentren, deren Zellkerne erheblich vergrößert sind und deren Cytoplasma fast nur aus einem kaum anfärbten Flüssigkeitssee besteht (Abb. 5). Die Cytoplasmareste sind nach der Zellperipherie hin verdrängt (Abb. 6). Die Kerne dieser Zellen erreichen das Vierfache der Fläche tetraploider Kerne der normalen Leber; die mittleren Kernflächen zeigen dementsprechend besonders zentral einen deutlichen Anstieg (Tab. 1, Abb. 1). Meist besitzen diese Kerne mehrere große Nucleolen und grobe Chromatinschollen an der Innenseite der Kernmembran. Vereinzelt findet man vakuolige Bildungen im Zellkern, welche sich von den Nucleolen durch ein optisch leeres Zentrum und durch das Fehlen einer Silberkornbelegung im Autoradiogramm nach Injektion von ^3H -Cytidin unterscheiden lassen. Die Kernmembran ist häufig tief eingefaltet und reicht in das Innere des Zellkerns hinein. Die Nucleolen stehen oft in Kontakt mit der Kernmembran. Innerhalb derartiger Herde werden auch Mitosen beobachtet. Gruppen derartiger Zellen nehmen kleinere oder größere Anteile des Läppchenzentrums ein und werden in der Läppchenperipherie niemals angetroffen. In peripheren Läppchenabschnitten ist das Cytoplasma dichter und stärker basophil, eine Einwässerung ist hier kaum nachweisbar.

Nach Injektion von ^3H -Cytidin heben sich die beschriebenen Zellgruppen durch ihre sehr starke Silberkornbelegung des Zellkerns deutlich von der Umgebung ab (Abb. 5, 6). Bei stärkerer Vergrößerung fällt die erhebliche Silberkorndichte über den Nucleolen auf, wobei jedoch auch die Chromatinverdichtungen dicht mit Silberkörnern belegt sind (Abb. 6, 7).

Die diese Herde umgebenden, ebenfalls zentralen, aber kaum vakuolisierten Zellen zeigen eine wesentlich geringere Silberkorndichte (Abb. 5, 6).

Dieses autoradiographische Bild manifestiert sich auch im Verhältnis der ermittelten Silberkorndichten. In Tabelle 3 und Abbildung 1 erkennt man, daß die Silberkorndichte dieser Gruppen stark vakuolisierten Zellen (als „Herd“ bezeichnet) über das Doppelte derjenigen anderer peripher oder zentral gelegener Leberzellen beträgt. Gleichzeitig erkennt man, daß im übrigen Lebergewebe sich der vorher signifikante Unterschied der Silberkorndichten zwischen den Kernen zentral und peripher liegender Leberepithelien ausgeglichen hat. Im Vergleich zum Plattenepithel der Zunge hat die Silberkorndichte über den Leberzellkernen dieser zentralen Herde erheblich gegenüber der normalen Leber zugenommen (Abb. 2).

Nach Injektion von ^3H -Leucin liegen im Autoradiogramm vorwiegend über den randständigen und kernnahen Cytoplasmabestandteilen Silberkörner. Die Silberkorndichte hat im Vergleich zum Plattenepithel der Zunge gegenüber der Norm abgenommen und liegt weit unter den Werten, die für das übrige Lebergewebe ermittelt werden.

120 Tage nach Versuchsbeginn besteht in großen Anteilen der Leber das gleiche histologische Bild wie nach 95 Tagen mit Gruppen großkerniger, stark eingewässerter Leberepithelien in zentralen Läppchenabschnitten mit zahlreichen Mitosen und nicht-vakuolisiertem, basophilem, scholligem Cytoplasma in der Läppchenperipherie. Daneben findet man aber einzelne Zellen, bei denen in kernnahen Cytoplasmaabschnitten eine Ansammlung basophiler Substanzen in scholliger Verteilung besteht, während jetzt periphere Cytoplasmabezirke vakuolisiert oder eingewässert sind.

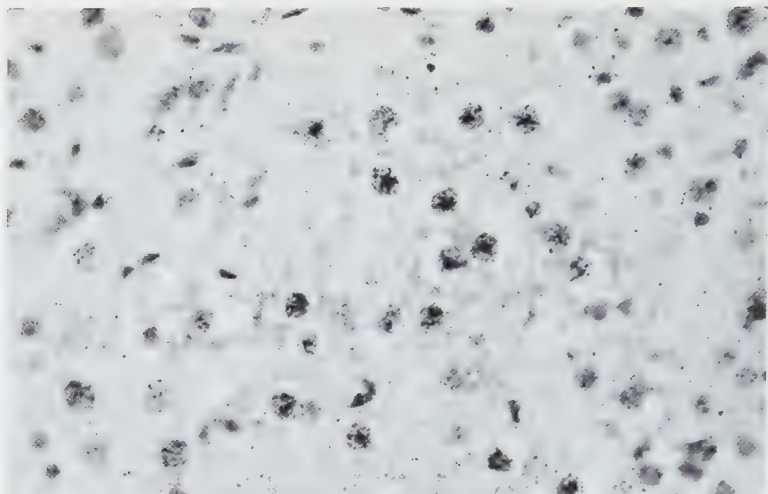


Abb. 5. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm des Lebergewebes 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin, 95. Tag der DAENA-Fütterung. Gruppe stark vakuolisierten, läppchenzentraler Leberepithelzellen mit einem gegenüber der gering vakuolisierten Umgebung stark erhöhten ^3H -Cytidin-Einbau des Zellkerns, besonders des Nucleolus.

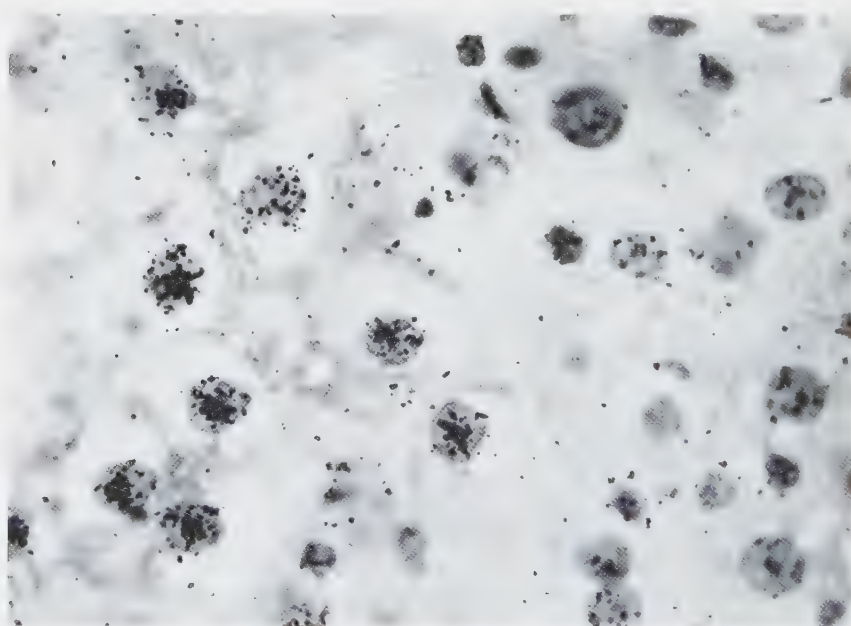


Abb. 6. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm von Leberepithelien 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin, 95. Tag der DAENA-Fütterung. Gruppe von Leberepithelzellen mit sehr starker Einwässerung des Cytoplasmas mit weitgehendem Verlust der Basophilie und großer Silberkorndichte, das heißt großer RNS-Neubildung im Zellkern, besonders in den Nucleolen. Umgebende gering vakuolisierte Zellen zeigen eine wesentlich kleinere Silberkorndichte. (Starke Vergr. aus Abb. 5.)

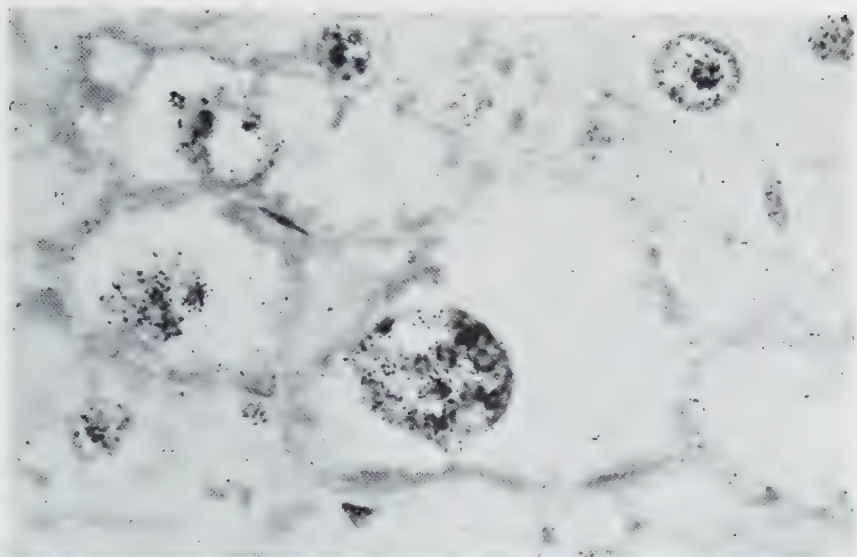


Abb. 7. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm von Leberepithelien 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin, 95. Tag der DAENA-Fütterung. Stark vergrößerter Zellkern inmitten eines hochgradig eingewässerten Cytoplasmas bei stark verminderter Basophilie. Vor allem innerhalb der Nucleolen gesteigerte RNS-Neubildung.

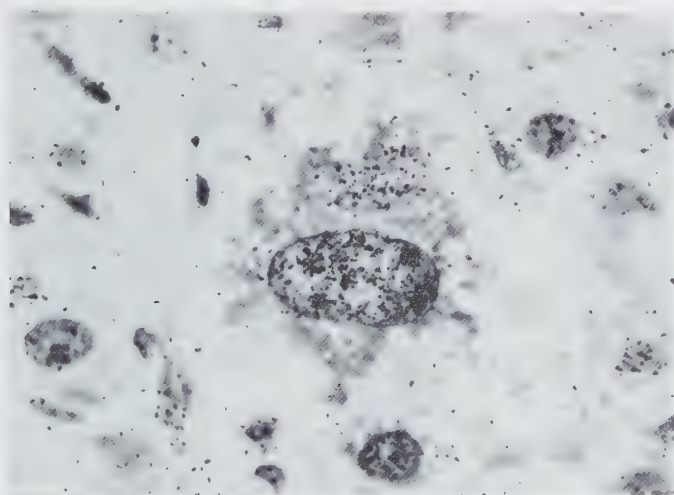


Abb. 8. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm einer Leberepithelzelle 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin, 120. Tag der DAENA-Fütterung. Stark vergrößerter Zellkern (vgl. die umgebenden Kerne) mit starker RNS-Neubildung, vor allem innerhalb der Nucleolen. Ansammlung basophiler Schollen in Kernnähe.

Die großen Kerne derartiger Zellen besitzen mehrere Nucleolen, die wie das dichte Chromatin stark mit Silberkörnern nach ^3H -Cytidin-Injektion beladen sind (Abb. 8).

Darüber hinaus findet man in einzelnen Schnittserien ein neues Bild: Inmitten stark geblähter und eingewässerter Leberzellen beobachtet man in unmittelbarer Nachbarschaft der Zentralvene kleine Herde stark basophil anfärbter Leberepithelien mit kleinen, hell erscheinenden, runden Kernen, die meist nur einen großen Nucleolus besitzen (Abb. 9). Diese Herde wurden von GRUNDMANN u. SIEBURG (1962) als

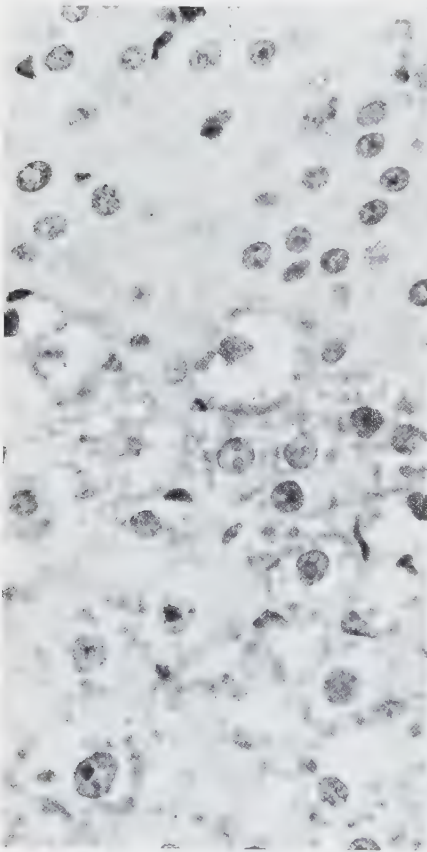


Abb. 9

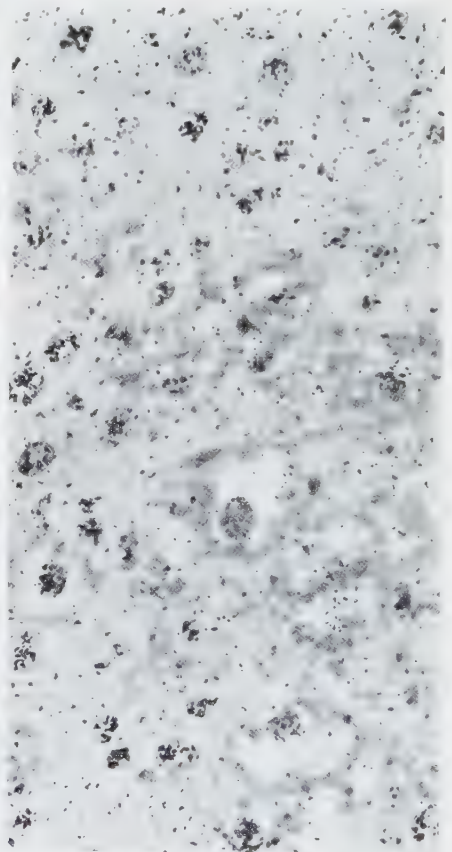


Abb. 10

Abb. 9. Zellen des sogenannten „Mikrocarcinoms“ (obere Bildhälfte) neben den stark eingewässerten Leberepithelien der Umgebung. Homogenes, basophiles Cytoplasma der Zellen des „Mikrocarcinoms“ mit kleinen Zellkernen. 120. Tag der DAENA-Fütterung, H. E.-Färbung.

Abb. 10. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm der gleichen Stelle wie in Abb. 9. Sowohl in den eingewässerten Leberepithelien (untere Bildhälfte) als auch in den Zellen des „Mikrocarcinoms“ besteht eine gegenüber der Norm stark gesteigerte Silberkorndichte über den Zellkernen als Zeichen einer starken RNS-Neubildung.

„Mikrocarcinome“ bezeichnet; wir werden im folgenden diese Bezeichnung übernehmen. Das stark basophile Cytoplasma läßt eine schollige Anordnung nicht erkennen, ist frei von Vakuolen und zeigt bei starker Vergrößerung häufig eine parallele lamelläre Strukturierung. Die Kernfläche dieser Zellen liegt weit unter der mittleren Kernfläche der normalen Leber (Tab. 1, Abb. 1, 17e). Nach cytophotometrischen DNS-Messungen von HOBIG u. GRUNDMANN (1962) handelt es sich hierbei um diploide Leberzellkerne. Nach Injektion von ^3H -Cytidin findet man sowohl über dem Nucleolus als auch über dem Chromatin dieser Kerne Silberkornansammlungen (Abb. 10). Bei kleiner mittlerer Kernfläche liegen die Silberkörner im Autoradiogramm verhältnismäßig dicht, so daß die mittlere Silberkorndichte dieser Zellen der „Mikrocarcinome“ größer ist als bei allen anderen bisher untersuchten Zellarten. Selbst die in der Umgebung der „Mikrocarcinome“ liegenden großkernigen, stark eingewässerten Zellen (mit „U“ bezeichnet), die bisher die größte Silberkorndichte besaßen, reichen nicht an die für diese Zellen ermittelten Werte heran (Tab. 3, Abb. 1). Wegen der großen Silberkorndichte heben sich diese kleinzelligen Herde bereits bei der Übersichtsvergrößerung im Autoradiogramm aus ihrer Umgebung heraus (Abb. 10).

Ein Vergleich der Silberkorndichten in eingewässerten Herden und im „Mikrocarcinom“ mit denen des mehrschichtigen Plattenepithels der Zunge zeigt, daß gegenüber der normalen Leber eine erhebliche Steigerung stattgefunden hat (Tab. 2, Abb. 2).

Nach Injektion von ^3H -Leucin beobachtet man im Vergleich zum Zungenepithel eine gegenüber der Norm deutliche Zunahme der Silberkorndichte über den Zellen des „Mikrocarcinoms“. Über den eingewässerten Zellen ist die Silberkorndichte weiterhin vermindert.

135 Tage nach Versuchsbeginn findet man bei beiden Versuchstieren das gleiche histologische Bild wie bei der Versuchszeit von 120 Tagen. Die Ausdehnung der „Mikrocarcinome“ hat zugenommen. Die Zahl der Mitosen ist wesentlich größer geworden.

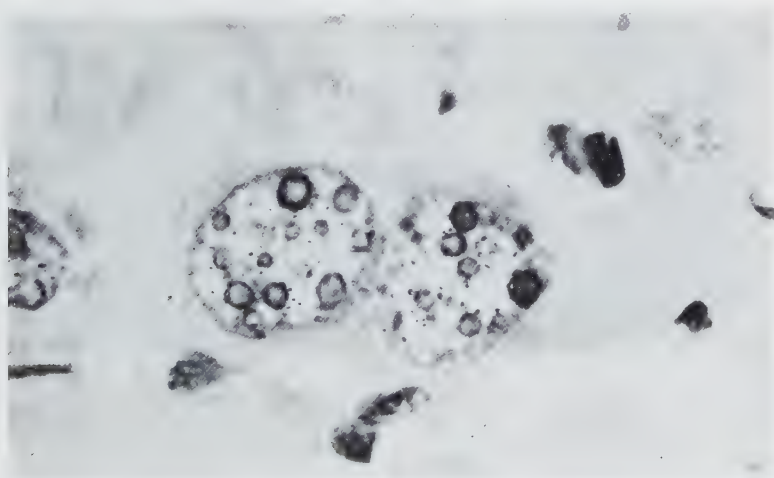


Abb. 11. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm einer doppelkernigen Leberepithelzelle 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin, 135. Tag der DAENA-Fütterung. Das Fehlen einer Silberkornbelegung der vakuoligen Kerneinschlüsse zeigt, daß es sich hierbei nicht um Nucleolen, sondern um Vakuolen handelt.

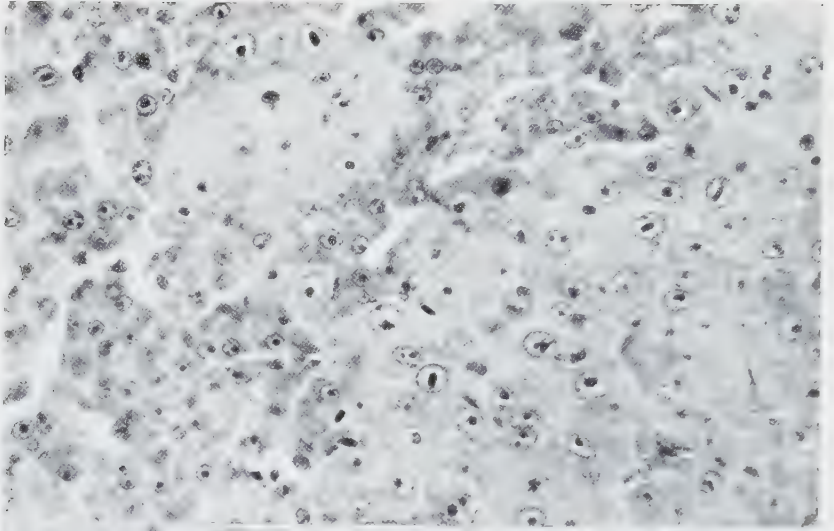


Abb.
12

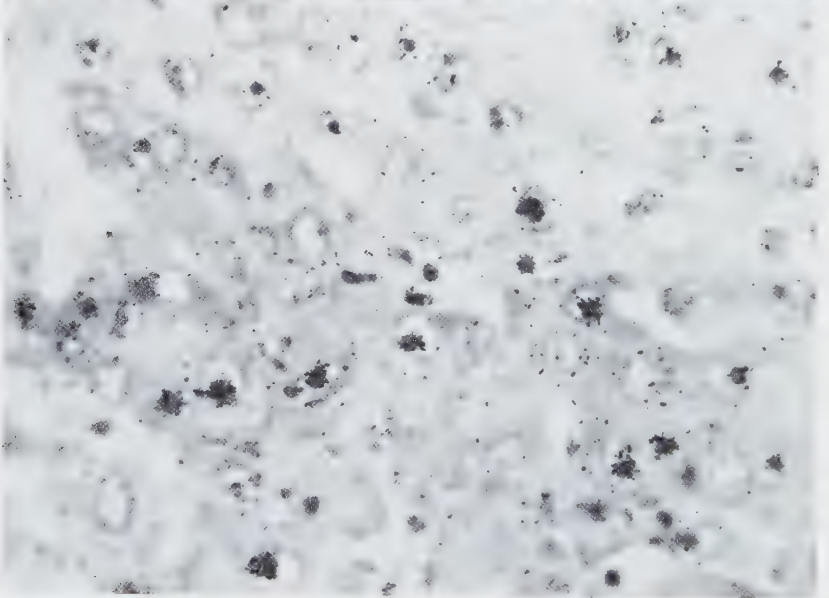


Abb.
13

Abb. 12. Frisches hepatozelluläres Carcinom (H. E.-Färbung), 150. Tag der DAENA-Fütterung. Große polymorphe Kerne mit vergrößerten Nucleolen. Homogene Basophilie des Cytoplasmas.

Abb. 13. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm der Grenzzone zwischen Carcinom und umgebendem Lebergewebe 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin, 150. Tag der DAENA-Fütterung. Bei deutlicher cytoplasmatischer Basophilie der Carcinomzellen stark vergrößerte Silberkorndichte über den Zellkernen, besonders über den großen Nucleolen, das heißt gegenüber der Umgebung stark vermehrte RNS-Neubildung.

In Abbildung 11 sind 2 Zellkerne wiedergegeben, in denen man die bereits beschriebenen Kernvakuolen erkennt, die sich von Nucleolen durch ihr helles Zentrum und durch das Fehlen der Silberkornbelegung im Autoradiogramm unterscheiden lassen.

150 und 162 Tage nach Fütterungsbeginn erkennt man bei allen untersuchten Tieren bereits bei der äußeren Betrachtung kleine, grauweiße bis graurötliche Herde, welche sich über die Oberfläche der Leber vorwölben. Im mikroskopischen Bild handelt

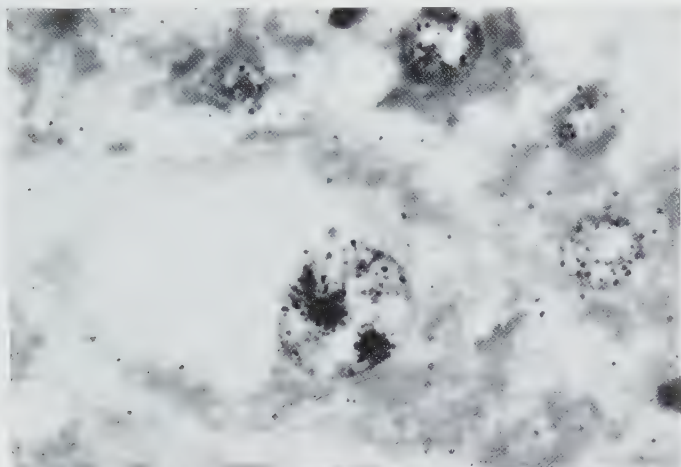


Abb.
14

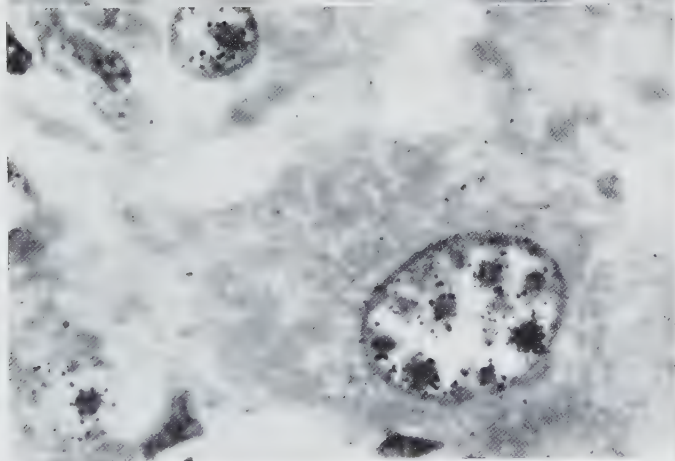


Abb.
15

Abb. 14. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm einer Leberzelle 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin, 135. Tag der DAENA-Fütterung. Außerordentlich dichte Silberkornbelegung beider Nucleolen des stark vergrößerten Zellkerns als Zeichen starker RNS-Neubildung. Ausgedehnte Einwässerung des Cytoplasmas.

Abb. 15. H. E.-gefärbtes Autoradiogramm einer Leberepithelzelle mit stark vergrößertem Zellkern 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin, 150. Tag der DAENA-Fütterung. Starke RNS-Neubildung in zahlreichen Nucleolen des vergrößerten Zellkerns bei feinkörniger diffuser Basophilie des Cytoplasmas.

es sich dabei um hepatozelluläre Carcinome mit unterschiedlich großen Kernen und Zellen, die zu soliden Zellverbänden angeordnet sind, das umgebende Lebergewebe komprimieren und an zahlreichen Stellen ein infiltrierendes Wachstum erkennen lassen (Abb. 12). Größere Knoten besitzen bereits zentrale Nekrosen, sind zum Teil zystisch umgewandelt oder umschließen große Bluträume. Die gegenüber der Norm stark vergrößerten (Abb. 1), unregelmäßig geformten Zellkerne besitzen große, plumpe Nucleolen und kleine, fleckförmige Chromatinverdichtungen an der Innenseite der Kernmembran (Abb. 17f). Zahlreiche, zum Teil multipolare Mitosen sind nachweisbar. Das Cytoplasma der Carcinomzellen ist reich an basophilen Substanzen (Abb. 12, 13).

Nach Injektion von ^3H -Cytidin sind die Kerne der Krebszellen vor allem innerhalb der infiltrierend wachsenden Randzone im Autoradiogramm dicht mit Silberkörnern belegt, wobei vor allem die Nucleolen dichte Silberkornhaufen besitzen (Abb. 13, 17f). Durch ihre starke Silberkornbelegung heben sich die Carcinomverbände auch im Übersichtsbild vom umgebenden Lebergewebe ab (Abb. 13). Die Silberkorndichte über den Zellkernen der Carcinomzellen übertrifft die ihrer Umgebung beträchtlich (Tab. 3, Abb. 1). Im Vergleich mit dem Zungenepithel findet man eine gegenüber der Norm erhebliche Steigerung der Silberkorndichte (Tab. 2, Abb. 2).

Im erhaltenen Lebergewebe liegen Herde stark eingewässerter Leberepithelien mit großen Kernen (Abb. 14) als auch cytologisch unveränderte kleinkernige Leberepithelien. Stellenweise sind auch noch „Mikrocarcinome“ nachweisbar. Daneben findet man Zellen, die neben einem vergrößerten Kern Ansammlungen basophiler Schollen im kernnahen Cytoplasma erkennen lassen, wie sie bereits bei der Versuchszeit von 120 Tagen beschrieben wurden. Einzelne Zellen mit übermäßig großen Kernen und zahlreichen Nucleolen, welche dicht mit Silberkörnern belegt sind, besitzen ein von dichten basophilen Massen in scholliger Anordnung ausgefülltes Cytoplasma (Abb. 15). Außerdem fallen Zellen auf, welche innerhalb eines wasserhellen Cytoplasmas bis zu 8 Zellkerne besitzen (Abb. 16). Derartige Zellen findet man vor allem in zentralen Läppchenabschnitten in der Nähe von „Mikrocarcinomen“.

Nach Injektion von ^3H -Leucin besteht im Carcinomgewebe eine gegenüber der Norm und gegenüber ihrer Umgebung stark erhöhte Silberkorndichte.

Zusammenfassung der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen anderer Autoren konnten auch wir beobachten, daß nach kontinuierlicher Verfütterung von Diäthylnitrosamin (5 mg/kg/Tag) nach etwa 150 Tagen bei den Ratten hepatozelluläre Carcinome zur Entwicklung kamen. Die während der Cancerisierung auftretenden Zellveränderungen sind vor allem durch cytoplasmatische Einwässerungen mit Verminderung der cytoplasmatischen Basophilie sowie durch Kern- und Nucleolenvergrößerungen gekennzeichnet. Diese Zellveränderungen verlagern sich mit zunehmender Versuchszeit immer mehr in die Läppchenzentren, in denen bei einer Versuchszeit von 120 Tagen auch die ersten „Mikrocarcinome“ zur Entwicklung kommen. Die in vorliegender Arbeit durchgeführten autoradiographischen Untersuchungen des RNS-Umsatzes nach Injektion von

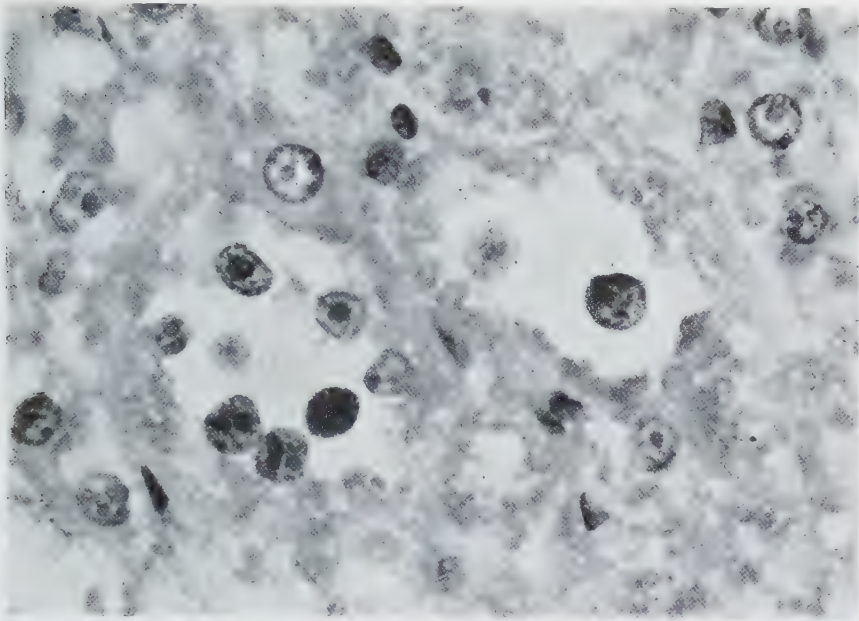


Abb. 16. 8kernige Leberepithelzelle mit stark eingewässertem Cytoplasma (H. E.-Färbung) am 150. Tag der DAENA-Fütterung.

^3H -Cytidin haben ergeben, daß vor allem innerhalb der großen, eingewässerten Zellelemente mit vergrößerten Kernen und Nucleolen eine erhebliche Steigerung der RNS-Neubildung erfolgt. Dabei kommt es nicht nur zu einer Zunahme der RNS-Synthese pro Gesamtkern, sondern zu einer Vergrößerung der Syntheseaktivität pro Flächeneinheit. Die größten Werte für die Silberkorndichte (= Syntheseaktivität pro Flächeneinheit) wurden für die sogenannten „Mikrocarcinome“ und die Zellen des voll ausgebildeten hepatozellulären Carcinoms gefunden. Der Steigerung der RNS-Neubildung im Zellkern steht dabei in den großen eingewässerten Zellen der Läppchenzentren eine Verarmung des Cytoplasmas an basophilen Substanzen gegenüber. Im „Mikrocarcinom“ und im hepatozellulären Carcinom sowie in einzelnen Zellelementen außerhalb der Carcinomzellverbände beobachtet man bei vergrößerter RNS-Synthese im Zellkern eine Anreicherung des Cytoplasmas mit Nucleoproteiden, die in Kernnähe einsetzt und dann auf alle Cytoplasmaabschnitte sich erstreckt; aber trotz Auffüllung der Krebszelle mit basophilen Nucleoproteiden sogar auf gegenüber der Norm mehrfach erhöhte Werte fällt die RNS-Syntheseaktivität im Zellkern nicht ab, sondern bleibt im Bereich der gemessenen Höchstwerte.

In der Leber unbehandelter Tiere ist die Silberkorndichte (relative Größe der RNS-Synthese pro Flächeneinheit) des Zellkerns in der Läppchenperipherie größer als im Läppchenzentrum. Dieses Verhältnis bleibt während der Cancerisierung weitgehend konstant und ändert sich erst mit Auftreten der Gruppen stark eingewässerter und vergrößerter Leberepithelien im Läppchenzentrum bei Versuchszeiten von 95, 120 und 135 Tagen.

Während der gesamten Beobachtungszeit erfolgt eine kontinuierliche Zunahme der RNS-Syntheseaktivität pro Flächeneinheit im Zellkern zentral gelegener Leberepithelien.

Die Einbauaktivität für ^3H -d,l-Leucin ist während der gesamten Versuchszeit gegenüber der Norm vermindert und steigt erst im „Mikrocarcinom“ und im voll ausgebildeten hepatozellulären Carcinom wieder an. Das Verteilungsmuster der Silberkörner im Autoradiogramm nach Injektion von ^3H -Cytidin, das heißt die Einbauorte des ^3H -Cytidins in fällbare RNS, bleibt während der gesamten Versuchszeit gleich. Immer ist der Nucleolus der Ort des stärksten Einbaues. Das Einbaumuster bei den stark variierenden Kerngrößen der Leberepithelien bei den verschiedenen Versuchszeiten und im Carcinom ist in einer Zusammenstellung von Autoradiogrammen gleicher photographischer Vergrößerung in Abbildung 17 deutlich erkennbar.

Theoretische Voraussetzungen für die Auswertung der Ergebnisse

Bei der Deutung der in den Präparaten nach Injektion von ^3H -Cytidin nachweisbaren autoradiographischen Schwärzung hat man sich zu fragen, inwieweit die im Gewebe fixierte Radioaktivität auf dem Einbau von ^3H -Cytidin in RNS beruht. Zunächst sei darauf hingewiesen, daß durch die Fixation in neutralem Formol und die anschließende Einbettung der Gewebe in Paraffin wasser- und lipoidlösliche Substanzen entfernt werden. Frühere Untersuchungen (FITZGERALD u. VINIČHAJUK 1959; OEHLERT

Abb. 17. Vergleich der Kerngrößen und der Cytidin-Einbauaktivität bei verschiedenen Versuchszeiten. Alle Abbildungen bei gleicher Vergrößerung aufgenommen. 60 Minuten nach Injektion von ^3H -Cytidin. H. E.-Färbung. a) Normale Leber: Schollige Basophilie des Cytoplasmas. RNS-Neubildung im Kern, vor allem im Nucleolus. b) 15 Tage DAENA-Fütterung: Kernnah beginnende Einwässerung des Cytoplasmas, Kernvolumenvergrößerung, verstärkte RNS-Neubildung. c) 95 Tage DAENA-Fütterung: Starke cytoplasmatische Einwässerung, weitere Kernvolumenvergrößerung und Steigerung der RNS-Synthese. d) 120 Tage DAENA-Fütterung: Diffuse cytoplasmatische Einwässerung, Kernvolumenvergrößerung und Steigerung der RNS-Synthese. e) „Mikrocarcinom“: Hochgradige Verringerung des Kernvolumens, diffuse Basophilie des Cytoplasmas ohne Vakuolen, starke RNS-Neubildung im Vergleich zur Kerngröße. f) Hepatozelluläres Carcinom: Diffuse homogene Basophilie des Cytoplasmas, starke Kernvolumenvergrößerung, hohe RNS-Neubildung vor allem in den 3 vergrößerten Nucleolen.

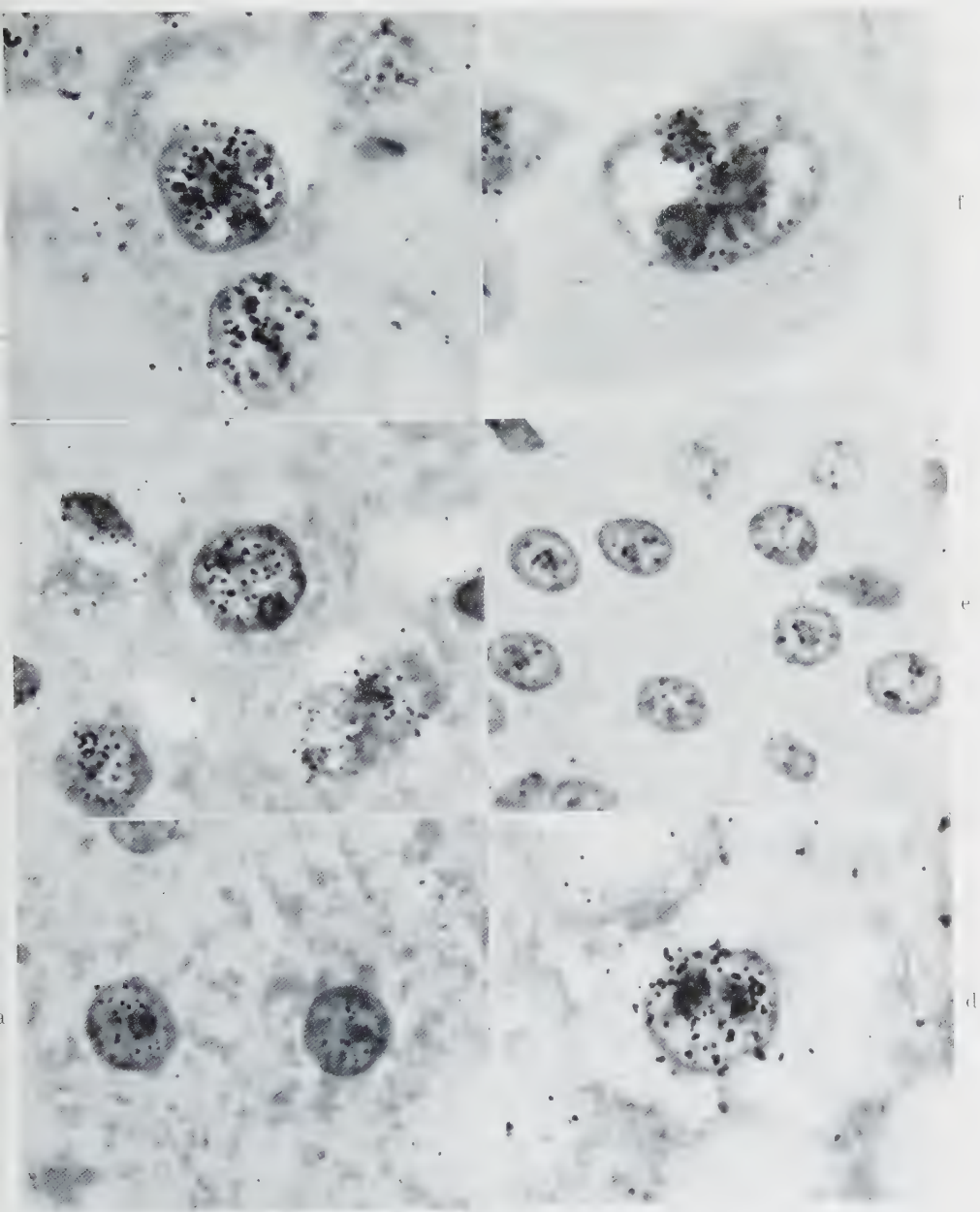


Abb. 17

1961; SCHULTZE, OEHLERT u. MAURER 1961; STÖCKER 1962) haben ergeben, daß nach Injektion von ^3H -Cytidin bzw. ^3H -Uridin die autoradiographisch nachweisbare Aktivität in Form fällbarer RNS im Gewebe vorliegt. Mit dieser Feststellung ist nichts über die Frage ausgesagt, ob die gesamte während der Versuchszeit synthetisierte RNS in den Gewebsschnitten erfaßt wird. Es wäre möglich, daß säurelösliche, mit Formalin nicht fällbare Fraktionen der RNS durch die Behandlung mit dem Fixationsmittel und durch die Einbettung verlorengehen. Aus diesem Grunde beschränken sich unsere Aussagen ausschließlich auf die durch Formalin fällbare RNS. Weiter hat man sich zu fragen, ob die durch die Autoradiographie nachweisbare Schwärzung ausschließlich Folge eines ^3H -Cytidin-Einbaues in de novo synthetisierte RNS-Moleküle ist oder ob hierbei auch Austauschvorgänge am fertigen RNS-Molekül im Sinne einer Terminaladdition eine Rolle spielen (STÖCKER 1962). Nach den Untersuchungen von FEINENDEGEN u. Mitarb. (1960, 1961) an HeLa-Zellen kann jedoch angenommen werden, daß die im Autoradiogramm nachweisbare ^3H -Cytidin-Aktivität vorwiegend von markierter RNS herrührt, welche während der Versuchszeit neu synthetisiert wurde.

Wie die Autoradiogramme bei einer Versuchszeit von 60 Minuten erkennen lassen, besteht zu diesem Zeitpunkt praktisch eine ausschließliche Markierung des Zellkerns. Wir erfassen somit bei dieser Versuchszeit nur die RNS-Neubildung im Zellkern.

Da ^3H -Cytidin sowohl in RNS als auch in DNS eingebaut wird, war bei der Auswertung der Ergebnisse zu entscheiden, worauf die Schwärzung der einzelnen Zellkerne im Autoradiogramm zurückzuführen ist. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt (FEINENDEGEN u. Mitarb. 1960, 1961), daß bei kurzen Versuchszeiten nur ein außerordentlich geringer Einbau von ^3H -Cytidin in die DNS erfolgt. In unseren Versuchen standen uns Paralleluntersuchungen mit ^3H -Thymidin zur Verfügung, so daß das Ausmaß der DNS-Synthese bei den verschiedenen Versuchszeiten bekannt war.

Zusammenfassend können wir damit feststellen, daß die in unseren Versuchen nachweisbare autoradiographische Schwärzung zum überwiegenden Teil auf die Markierung fällbarer, neu gebildeter RNS zurückzuführen ist. Die Schwärzungsintensität des Zellkerns im Autoradiogramm kann somit als Maß für die relative Größe der RNS-Neubildung im Zellkern angesehen werden, wobei die Silberkornzahl ein Maß für die Größe der RNS-Synthese pro Gesamtkern ist, während die Silberkorndichte das Ausmaß der RNS-Synthese pro Flächeneinheit angibt. Unter identischen Versuchsbedingungen und bei der Auswertung von Vergleichsgeweben konnte somit durch Silberkornauszählungen die relative Größe der RNS-Neubildung bestimmt werden. In vorliegenden Versuchen konnte die unterschiedliche β -Selbstabsorption in den verschiedenen Zellstrukturen vernachlässigt werden, da ausschließlich die Silberkornzahlen über Zellkernen miteinander verglichen wurden. (MAURER u. PRIMBSCH 1963).

In einer Reihe früherer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Inkorporationsgröße einer Aminosäure als Maß für die relative Größe der Proteinsynthese einer bestimmten Zellart angenommen werden kann (MAURER 1959; SCHULTZE, OEHLERT u. MAURER 1960; HEMPEL, LENNARTZ u. MAURER 1962). Da in unseren Untersuchungen nach Injektion von ^3H -Leucin die Silberkorndichten in Autoradiogrammen der Leber mit den Silberkorndichten des mehrschichtigen Plattenepithels der Zunge desselben Versuchstieres verglichen wurden, sind die so erhaltenen Verhältniswerte von Tier zu Tier vergleichbar und können Anhaltspunkte über die Veränderung der Proteinsynthese während der verschiedenen Stadien der Cancerisierung liefern.

Besprechung der Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen anderer Autoren konnten wir feststellen, daß die zunächst diffus über das gesamte Lebergewebe sich erstreckenden Zellveränderungen nach kürzerer Diäthylnitrosaminbehandlung (15–65 Tage) sich immer mehr in die Läppchenzentren verlagerten und daß der Beginn des Krebswachstums ausschließlich auf die Läppchenzentren beschränkt war (GRUNDMANN und SIEBURG 1962; HOBİK und GRUNDMANN 1962; COTÉ, OEHLERT und BÜCHNER 1962). Damit erhebt sich die Frage nach der Ursache dieses für die Diäthylnitrosaminfütterung charakteristischen Schädigungsmusters. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß das Diäthylnitrosamin erst durch eine fermentative Umwandlung seine schädigende Wirkung auf die Leberzelle entfalten kann (DRUCKREY 1962), drängt sich die Annahme auf, daß die Fermentaktivität in denjenigen Zellen am stärksten ist, die bevorzugt verändert werden. Diese Annahme würde eine unterschiedliche Fermentaktivität in zentralen und peripheren Läppchenabschnitten voraussetzen. Vielleicht könnte die histochemische Bestimmung der Enzymkonzentrationen darüber genauere Auskunft erbringen, zumal quantitative zonale Differenzen der Enzymaktivitäten innerhalb desselben normalen Leberläppchens histochemisch nachgewiesen wurden (SCHUMACHER 1958).

Daß hinsichtlich des Nucleinsäurestoffwechsels zonale Unterschiede zwischen läppchenperipheren und zentralen Leberbezirken bestehen, konnten unsere Untersuchungen beweisen. So wurde in den Leberzellen peripherer Läppchenabschnitte eine signifikant größere RNS-Neubildung pro Flächeneinheit des Zellkerns gefunden als in läppchenzentral gelegenen Leberzellen. Diese Unterschiede, die sich in unseren Versuchen in einer unterschiedlichen Silberkorndichte im Autoradiogramm nach Injektion von ^3H -Cytidin äußerten, blieben bis zum 95. Versuchstag signifikant. Auch in autoradiographischen Untersuchungen zur Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie wurde ein unterschiedliches Verhalten läppchenzentral und -peripher liegender Leberepithelien im Nucleinsäurestoffwechsel gefunden. Dabei setzte zunächst in der Peripherie eine Verarmung des Cytoplasmas an Nucleoproteiden und eine starke Zunahme von DNS-Synthesen ein, lange bevor dies auch in den zentralen Zellen der Fall war (OEHLERT, HÄMMERLING und BÜCHNER 1962). Trotzdem bleibt die Frage nach der Ursache dieser zonalen Differenzen letztlich noch offen, und die vielfach zur Erklärung herangezogene unterschiedliche Blut- und Sauerstoffversorgung des Läppchens kann nur einen Teil der beobachteten Erscheinung erklären.

Wenn wir uns im folgenden mit den Veränderungen der Einzelzelle während der Entwicklung zum hepatozellulären Carcinom beschäftigen, so sollen zunächst die Größen- und die Stoffwechselveränderungen des Zellkerns besprochen werden, wie sie in vorliegenden Untersuchungen durch Kernflächenmessungen und den autoradiographischen Nachweis der RNS-Neubildung erfaßt werden.

Wie aus Tabelle 1 und Abbildung 1 hervorgeht, besteht auch in der normalen Rattenleber ein signifikanter Unterschied zwischen der mittleren Kernfläche peripherer und zentraler Läppchenabschnitte. Stets wurden für die mittleren Kernflächen im Läppchenzentrum höhere Werte gefunden. Dieser Unterschied kann durch ein unterschiedliches Mengenverhältnis zwischen di-, tetra- und oktoploiden Zellkernen bedingt sein. Eine entsprechende Auswertung unserer Meßwerte wurde jedoch nicht vorgenommen, da vor allem unter pathologischen Bedingungen das Kernvolumen keine exakten Rückschlüsse auf die Ploidiestufe zuläßt (SCHRAEDER und LEUCHTENBERGER 1950; vgl. auch RATHER 1958). Mit Beginn der Diäthylnitrosaminfütterung beobachtet man nun eine zunehmende Vergrößerung der mittleren Kernflächen, welche die Läppchenzentren stärker betrifft als die Läppchenperipherie, so daß sich die Unterschiede zwischen den mittleren Kernflächen vergrößern. Den größten Unterschied und die größten Kernflächen – das polymorphkernige Carcinom ausgenommen – beobachtet man bei den Versuchszeiten von 95 und 120 Tagen, bei denen in den Läppchenzentren Leberepithelien mit außerordentlich großen Zellkernen auftreten. Wie die Auswertung unserer Einzelmessungen ergab, handelt es sich bei den in den ersten Versuchszeiten auftretenden Vergrößerungen der mittleren Kernflächen vorwiegend um den Ausdruck eines funktionellen Kernödems (BENNINGHOFF 1950) als Ausdruck einer gesteigerten Stoffwechselleistung des Kernes. Diese vergrößerte Stoffwechselleistung findet ihren Ausdruck in der mit zunehmender Kerngröße sich steigernden Einbauaktivität von ^3H -Cytidin in fällbare RNS (Abb. 2). Die größte RNS-Neubildung, gemessen am ^3H -Cytidin-Einbau, findet sich dabei bis zum Ausbruch des Carcinoms in den stark eingewässerten Zellen mit vergrößerten Zellkernen und Nucleolen, welche bei Versuchszeiten von 95 und 120 Tagen das histologische Bild der Läppchenzentren charakterisieren. Diese Zellkerne besitzen nach unseren Messungen in Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen von GRUNDMANN und SIEBURG (1962) ein Mehrfaches der Kernfläche der tetraploiden „Regelklasse“ der normalen Rattenleber und nach cytophotometrischen DNS-Messungen von HOBİK und GRUNDMANN (1962) echte Vielfache der normalen DNS-Klassen. Zu der Kernvergrößerung durch vermehrte Hydra-

tation als Ausdruck einer gesteigerten Syntheseleistung treten demnach Polyploidisierungen, die in den zentralen Läppchenabschnitten ihr größtes Ausmaß erreichen. Dementsprechend wurde in den Untersuchungen von COTÉ, OEHLERT und BÜCHNER (1962) innerhalb dieser Zellgruppen ein besonders hoher Prozentsatz ^3H -Thymidin-markierter Zellen als Ausdruck lebhafter DNS-Synthesen gefunden. Auch diese mit der Fütterungszeit progredient ansteigenden interphasischen DNS-Verdoppelungen müssen besonders bei späteren Versuchszeiten in die Zunahme der mittleren Kernfläche mit eingehen.

Würde nun die Größe der RNS-Synthese der Vergrößerung der Kernfläche bzw. des Kernvolumens parallel gehen, wie dies unter physiologischen Bedingungen der Fall ist (STÖCKER 1962), so sollte die Silberkorndichte, das heißt die RNS-Neubildung, (gemessen am ^3H -Cytidin-Einbau) pro Flächeneinheit etwa gleich bleiben. Dies ist aber, wie vorliegende Versuche ergeben haben, nicht der Fall. Vor allem innerhalb der läppchenzentralen Gruppen stark vakuolisierter Leberepithelien kommt es zu einem erheblichen Anstieg der RNS-Synthese pro Flächeneinheit des Kerns, die dann im „Mikrocarcinom“ und im voll ausgebildeten Leberzellcarcinom ihre höchsten Werte erreicht. Diese Steigerung der Größe der RNS-Synthese pro Flächeneinheit des Zellkerns während der Cancerisierung der Leber ist deshalb von besonderem Interesse, weil sie auch bei der experimentellen Cancerisierung der Mäuseepidermis durch Methylcholanthrenpinselung beobachtet wurde (OEHLERT und v. PEIN 1963).

Wir sind uns der Tatsache bewußt, daß die unseren Überlegungen zugrunde liegende Steigerung der Silberkorndichte in Autoradiogrammen nach Applikation von ^3H -Cytidin auch durch andere Faktoren, wie eine Terminaladdition von Nucleotiden an RNS-Moleküle oder durch eine veränderte Zusammensetzung der synthetisierten RNS beeinflußt werden kann (s. STÖCKER 1962) und daß auch in der normalen Pankreaszelle bei extremer funktioneller Belastung eine Steigerung der RNS-Synthese pro Kernvolumeneinheit beobachtet wurde, die allerdings nur auf eine bestimmte Stoffwechselphase beschränkt ist (STÖCKER 1962). Dennoch sind wir der Meinung, daß die sowohl bei der experimentellen Cancerisierung der Mäuseepidermis als auch bei der Cancerisierung der Leber in völliger Übereinstimmung aufgefundene Steigerung der RNS-Neubildung pro Volumeneinheit des Zellkerns eine Veränderung des Kernstoffwechsels darstellt, die zumindest typisch für die Umwandlung der normalen Parenchymzelle in eine Krebszelle ist.

Wie aus der Beschreibung der Versuchsergebnisse hervorgeht, sind diese bisher besprochenen Kernveränderungen, die mit einer Steigerung

der Syntheseaktivität für RNS einhergehen, mit cytoplasmatischen Veränderungen verknüpft, die ihrerseits in den Zellen ihre stärkste Ausbildung erfahren, deren Zellkerne die größte Einbausteigerung von ^3H -Cytidin erkennen lassen.

Wir haben beschrieben, daß zusammen mit einer cytophotometrisch signifikant belegten (HOBIG und GRUNDMANN 1962) läppchenzentralen Verarmung des Cytoplasmas an basophilen Nucleoproteiden eine zunehmende Aufblähung des Zelleibes und eine Vakuolisierung des Cytoplasmas einsetzt, die in Kernnähe ihren Anfang nimmt und schließlich ein derartiges Ausmaß annehmen kann, daß in Extremfällen der Zellkern in einem optisch fast leeren oder mit einem dünnen, zum Teil fädigen EW-Sol gefüllten Flüssigkeitssee zu schwimmen scheint. Diesen im lichtmikroskopischen Bild so eindrucksvollen Veränderungen liegen nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine Schwellung und zunehmende Vakuolisierung des endoplasmatischen Reticulums mit Zerstreuung, zum Teil auch Verminderung der RNS-Partikel bei intakten Mitochondrien zugrunde, wie für das Diäthylnitrosamin (MÖLBERT, HILL und BÜCHNER 1962) in gleicher Weise wie für das 3'-Me-DAB (PORTER und BRUNI 1959) und das Dimethylnitrosamin (DMNA) (EMMELOT und BENEDETTI 1960) nachgewiesen werden konnte.

Im Gegensatz zu der vakuoligen Veränderung und der als irreversibel beschriebenen blasigen Entartung der Leberzelle, zum Beispiel bei exogenem Sauerstoffmangel oder bei oxydationshemmenden Giften (PICHOTKA 1942; MÜLLER und ROTTER 1942; HESSE 1942; ALTMANN 1944, 1949, 1955; vgl. auch KETTLER 1958), zeigen die vakuolig bis blasig veränderten Leberzellen bei der Diäthylnitrosaminvergiftung deutlich vergrößerte Zellkerne mit vergrößerten, oft auch vermehrten Nucleolen. Durch die Fähigkeit dieser Zellen zur DNS-Synthese (COTÉ, OEHLERT und BÜCHNER 1962) und den Nachweis von zahlreichen Zellteilungsfiguren sowie die Fähigkeit zur RNS-Synthese läßt sich die cytoplasmatische Veränderung als „agonales“ Phänomen der Zelle ausschließen. Wir konnten in unseren Autoradiogrammen darüber hinaus nachweisen, daß in den vergrößerten Zellkernen sogar eine stark gesteigerte RNS-Synthese abläuft, wobei vor allem der oder die Nucleolen sich durch einen überaus lebhaften Einbau von ^3H -Cytidin in fällbare RNS auszeichnen.

Es steht demnach bei diesen Leberepithelien eine erhöhte RNS-Neubildung im Kern einer Verarmung des Cytoplasmas an Ribonucleoproteiden gegenüber, welche bis zum Abbau der spezifischen Strukturen des Ergastoplasmas – elektronenmikroskopisch gekennzeichnet durch das Auftreten strukturfreier Bezirke (MÖLBERT, HILL und BÜCHNER 1962) –

und zur vakuoligen Umwandlung des Zelleibes gehen kann. Diese Diskrepanz zwischen vermindertem Ribonucleoproteidgehalt im Cytoplasma und gesteigerter RNS-Neubildung im Kern ist aber keinesfalls spezifisch für die Fütterung von Diäthylnitrosamin, sondern findet sich prinzipiell gleichartig bei einer ganzen Reihe von Schädigungen der Leber.

Zum Beispiel fanden RATHER (1951) und nach ihm zahlreiche weitere Untersucher (LAIRD 1953; CARNES, BERNSTEIN und RATHER 1953; HEIZER 1955; GUPTA 1956; KLEINFELD 1957; KLEINFELD und VAN HAAM 1959; RÜTTNER, RONDEZ und GASSMANN 1959; RÜTTNER und RONDEZ 1960; ALTMANN und OSTERLAND 1961; RONDEZ, RÜTTNER und VOGEL 1962) bei der Thioacetamidvergiftung in der Leber von Ratten bereits nach 2 Tagen eine nach Absetzen der Substanz reversible Verdoppelung des durchschnittlichen Kernvolumens, eine starke Größenzunahme der Nucleolen mit entsprechend gesteigertem Einbau von ^3H -Cytidin in RNS (STRÖCKER 1963) und eine Abnahme der cytoplasmatischen Basophilie.

Nach langdauernder Fütterung von Äthionin beschrieb POPPER (1953) das Auftreten von großen Leberzellen mit riesigen, manchmal mehreren Kernen und sehr großen Nucleolen. Auch hierbei treten nach Verarmung des Cytoplasmas an basophilen Substanzen neben Verfettungen Aufhellungen und fettfreie Vakuolisierungen auf, die vor allem in den ersten Tagen nach Absetzen des Äthionins starke Ausmaße annehmen (OEHLERT, KRAMSCH und BECK 1963), und im elektronenmikroskopischen Bild konnte ein Abbau von Strukturen des Ergastoplasmas der Pankreaszelle beobachtet werden (SEIFERT und GIESEKING 1961; HERMAN und FITZGERALD 1962).

Interessanterweise führen beide Substanzen, die in ihren cytologischen Veränderungen denen bei der Diäthylnitrosaminfütterung so stark ähneln, bei langdauernder Applikation ebenfalls zu malignen Tumoren, wie von GUPTA (1956) für das Thioacetamid und von POPPER (1953) sowie von FARBER (1956) für das Äthionin nachgewiesen wurde.

Neben der Einwirkung chemisch definierter Substanzen können jedoch auch völlig andersartige Einwirkungen auf die Leber ähnliche Zellveränderungen verursachen. So findet man zum Beispiel nach Teilhepatektomie in der Rattenleber, beginnend in peripheren Läppchenabschnitten, nach 24–36 Stunden eine vorübergehende Verarmung des Cytoplasmas an basophilen Substanzen mit dem Auftreten von zum Teil fettfreien Vakuolen (ATERMAN 1952) neben erheblichen Kern- und Nucleolenvergrößerungen (GRUNDMANN und BACH 1960; OEHLERT, HÄMMERLING und BÜCHNER 1962 u. a.).

Versucht man die bei den geschilderten Beispielen zu beobachtende Diskrepanz zwischen hoher RNS-Synthese im Kern und vermindertem cytoplasmatischem RNS-Gehalt zu erklären, so kommen folgende Möglichkeiten in Betracht:

1. RATHER (1958) äußerte die Vermutung, daß dieser Befund bei der Thioacetamidvergiftung auf einer Verschiebung von Nucleoproteiden vom Cytoplasma in den Kern beruhe. RATHER glaubt sich dabei in Übereinstimmung mit BRACHET (1950), der den Verlust der Pyroninophilie im Cytoplasma von Mitosezellen mit dem Verbrauch von RNS bei der DNS-Neubildung des Kernes deutete. Daß RNS-Fraktionen ein Reservoir an Pyrimidinnucleotiden für die DNS-Synthese darstellen, haben die Untersuchungen von FEINENDEGEN und Mitarb. (1960, 1961) gezeigt. Die Verminderung des cytoplasmatischen Ribonucleoproteidgehaltes ist aber bereits 2 Tage nach Diäthylnitrosaminfütterung in den Läppchenzentren statistisch signifikant (HOBİK und GRUNDMANN 1962). Es erscheint unwahrscheinlich, daß ein Mitoseindex von unter 2⁰/₁₀₀ (GRUNDMANN und SIEBURG 1962) bzw. ein ³H-Thymidinindex von unter 8⁰/₁₀₀ (COTÉ, OEHLERT und BÜCHNER 1962) ausreichen, um schon so frühzeitig auftretende Veränderungen zu erklären.

2. Es besteht die Möglichkeit, daß ein Mißverhältnis zwischen dem Verbrauch der cytoplasmatischen RNS und der RNS-Synthese im Kern die Ursache für die RNS-Verarmung des Cytoplasmas darstellt. Wir wissen heute, daß jegliche EW-Neubildung im Cytoplasma an das Vorhandensein cytoplasmatischer RNS gebunden ist (CASPERSSON 1941), wobei eine direkte Proportionalität zwischen Größe der EW-Neubildung im Cytoplasma und cytoplasmatischem RNS-Gehalt (NIKLAS und OEHLERT 1956; FICQ und BRACHET 1956) bzw. zwischen EW-Umsatz und RNS-Neubildung im Kern (SCHULTZE, OEHLERT und MAURER 1961) besteht. Die RNS-Synthese im Kern wird anscheinend vom RNS-Bedarf des Cytoplasmas gesteuert (STRÖCKER 1962). Es wäre nun denkbar, daß bei übermäßiger Proteinsynthese im Cytoplasma vorübergehend mehr RNS verbraucht wird, als durch Nachlieferung vom Kern trotz gesteigerter Syntheseleistung ersetzt werden kann, so daß eine Verarmung des Cytoplasmas an Ribonucleoproteiden eintritt. Die Möglichkeit eines derartigen Vorganges wurde bereits für die regenerierende Leber der Ratte nach Teilhepatektomie diskutiert (OEHLERT, HÄMMERLING und BÜCHNER 1962). In unseren autoradiographischen Untersuchungen zur EW-Neubildung konnte bei den Versuchszeiten, bei denen schon eine erhebliche Steigerung der RNS-Synthese im Kern nachweisbar war und vor allem in den Zellen, die die größte Kern-RNS-Synthese erkennen ließen, keine Einbausteigerung von

^3H -Leucin gefunden werden, sofern man die Schwierigkeit berücksichtigt, bei so starken Änderungen der Zellgröße annähernd vergleichbare Flächeneinheiten zu schaffen. Für das verwandte Dimethylnitrosamin konnte schon nach 3 Stunden sowohl in vitro wie in vivo eine Hemmung der Proteinsynthese, gemessen am Einbau markierter Aminosäuren, um 50%, und mehr nachgewiesen werden (MAGEE 1957, 1958; MAGEE und VANDERKAR 1958; BROUWERS und EMMELOT 1960; HULTIN und Mitarb. 1960). Diese Befunde sprechen gegen die Annahme, daß die Abnahme der cytoplasmatischen Basophilie durch einen erhöhten Verbrauch bei der Proteinsynthese trotz vermehrter Nachlieferung vom Kern zustande kommt.

3. ALTMANN und OSTERLAND (1961) haben bei der chronischen Thioacetamidvergiftung die Diskrepanz zwischen cytoplasmatischem und nucleärem RNS-Gehalt besonders betont und aus der Morphologie der Kernveränderungen die von uns gezeigte gesteigerte RNS-Synthese indirekt erschlossen. Sie sehen aber die Ursache dieser Dissoziation in einer Einschränkung oder Unterbindung der nuclearen Stoffabgabe an das Cytoplasma (vgl. auch KLEINFELD 1957) und deuten die von ihnen aufgefundenen cytoplasmatischen Wirbelbildungen geradezu als ribonucleoproteidarme oder -freie Derivate des Ergastoplasmas.

Der vermehrte Einbau von ^3H -Cytidin in die nucleolare RNS und in die RNS des Kernchromatins beweist aber für das Diäthylnitrosamin, daß es sich bei den vergrößerten und vermehrten Nucleolen nicht um eine bloße Stapelung handelt, sondern daß diese „überfüllten“ Nucleolen sogar eine stark gesteigerte Syntheseaktivität besitzen. Trotzdem wird eine endgültige Aussage darüber erst möglich sein, wenn Untersuchungen mit markierten RNS-Vorläufern und längeren Versuchszeiten zwischen Injektion und Tötung des Tieres vorliegen, die eine Verzögerung oder Blockade der Ribonucleoproteidabgabe vom Kern im Vergleich zum Normalgewebe beweisen oder widerlegen. Jedenfalls besteht von einem bestimmten Zeitpunkt der Einwirkung des Thioacetamid an genauso wie für das Diäthylnitrosamin sicher keine Abgabeblockade mehr, da sowohl das Cytoplasma der hyperplastischen bzw. neoplastischen Zellen bei der Thioacetamid-erzeugten Cholangiofibrose (GUPTA 1956) als auch die Zellen des sogenannten „Mikrocarcinoms“ und des Carcinoms durch Diäthylnitrosamin sich durch ihre dichte Basophilie (GRUNDMANN und SIEBURG 1962) und ihren stark erhöhten Gehalt an cytoplasmatischen Ribonucleoproteiden auszeichnen (HOBİK und GRUNDMANN 1962).

4. Wir möchten nach dem bisher Ausgeführten noch eine weitere Möglichkeit in den Vordergrund rücken, nämlich die, daß die vom Kern vermehrt gebildeten und wahrscheinlich auch an das Cytoplasma

abgegebenen Ribonucleoproteide deswegen nicht zu einer Beseitigung des cytoplasmatischen Defizits ausreichen, weil sie auf dem Wege von ihrer Bildungsstätte im Kern zum Cytoplasma oder dort selbst durch die fort-dauernde Einwirkung des Diäthylnitrosamin verändert oder abgebaut werden.

Man kann sich die Wirkung der Nitrosamine heute folgendermaßen vorstellen: Durch spezifische, in den einzelnen Organen unterschiedlich vorhandene, O_2 -abhängige Fermente werden sie rasch dealkyliert. Das entstehende instabile Diazoalkan wird zur eigentlich wirksamen Substanz, deren Zerfall ein Carbenium-Ion liefert, das stark alkylierend wirkt und besonders die cytoplasmatische RNS angreift (DRUCKREY und Mitarb. 1961, 1962). Versuche mit ^{14}C -markiertem Dimethylnitrosamin konnten weiter zeigen, daß nach Inkubation von Leberschnitten mit ^{14}C -Dimethylnitrosamin in vitro die spezifische Aktivität zum kleineren Teil in den Leberproteinen nachweisbar war, besonders am Histidinmolekül in 1- und 3-Stellung. Der Hauptanteil fand sich in einem Nucleinsäuregemisch der Leber, chromatographisch in einem Gipfel, der aber noch nicht identifiziert werden konnte (MAGEE und HULTIN 1962). MAGEE u. FARBER (1962) konnten darüber hinaus durch in vivo Versuche mit ^{14}C -Dimethylnitrosamin zeigen, daß der größte Anteil der Aktivität in einem Guaninderivat, in dem 7-Methyl-Guanin der RNS, zum kleineren Teil aber auch in der DNS der Leber nachweisbar war. Das alkylierende Agens scheint demnach eine besondere Affinität zum Imidazolring (Histidin, Guanin) zu haben. Ferner konnte von diesen Autoren wahrscheinlich gemacht werden, daß die Methylierung am intakten RNS-Molekül angreift, da in der säurelöslichen Fraktion der RNS keine Aktivität gefunden wurde. Alkylierungen am Guaninmolekül in 7'-Stellung sind mit zahlreichen alkylierenden Substanzen von mehreren Autoren nachgewiesen worden, in vitro durch LAWLEY u. WALLICK (1957), REINER u. ZAMENHOF (1957), SHAW, zit. nach MAGEE u. FARBER (1962), sowie von BROOKES u. LAWLEY (1960, 1961) auch in vivo, sowohl in der RNS als auch in der DNS.

Wir nehmen nun an, daß in Analogie zum Dimethylnitrosamin auch bei der Diäthylnitrosaminfütterung Alkylierungen an der RNS auftreten, die eventuell infolge eines beschleunigten Abbaues eine Verminderung ihres cytoplasmatischen Gehaltes zur Folge haben, da sich die läppchenzentrale Verminderung des cytoplasmatischen RNS-Gehaltes weder durch einen vermehrten Verbrauch für eine gesteigerte Proteinsynthese noch durch eine mangelhafte Neubildung im Kern erklären läßt, ja, die nucleäre RNS-Synthese sogar kompensatorisch gesteigert ist. Beides, sowohl die Verminderung als auch vor allem das Auftreten von „veränderten“

makromolekularen RNS-Molekülen, müßte zur Folge haben, daß die RNS ihre normale Funktion bei der Proteinsynthese nicht versehen kann; vielleicht werden durch das Diäthylnitrosamin direkt auch atypische Proteine (alkyliertes Histidin; MAGEE u. HULTIN 1962) gebildet. Tatsächlich ist der Einbau markierter Aminosäuren in die Proteine des Cytoplasmas nach Einwirkung von Dimethylnitrosamin *in vitro* wie *in vivo* genauso vermindert (MAGEE 1957, 1958; MAGEE u. VANDEKAR 1958; BROUWERS u. EMMELOT 1960; HULTIN u. Mitarb. 1960), wie unsere Untersuchungen nach Fütterung von Diäthylnitrosamin für ^3H -Leucin zeigen konnten. Diese reduzierte Proteinsynthese kann aber bei fortlaufendem Abbau im Rahmen des EW-Umsatzes zu dem elektronenmikroskopisch nachweisbaren Abbau von Strukturen des Ergastoplasmas führen, wie er von MÖLBERT, HILL u. BÜCHNER (1962) beschrieben wurde.

Der stark verminderte cytoplasmatische Ribonucleoproteidgehalt ändert sich aber schlagartig in den bei einer Versuchszeit von 120 Tagen auftretenden „Mikrocarcinomen“ und im voll ausgebildeten hepatozellulären Carcinom. Darüber hinaus wurden bei den gleichen Versuchszeiten einzelne große Zellen beschrieben, bei denen in kernnahen Cytoplasmaabschnitten bereits wieder reichlich schollige, basophile Nucleoproteide nachweisbar waren. Trotzdem war die Silberkorndichte über den Kernen dieser Einzelzellen enorm hoch und erreichte im „Mikrocarcinom“ und im Carcinom die höchsten gemessenen Werte, das heißt, daß trotz Auffüllung des vorher bestehenden cytoplasmatischen Ribonucleoproteiddefizits, sogar auf das 2,5–3fache des Normalwertes (HOBIG u. GRUNDMANN 1962), die nucleäre RNS-Synthese (gemessen am ^3H -Cytidin-Einbau) pro Flächeneinheit nicht abfällt, sondern die höchste Steigerung erfährt. Es erscheint am wahrscheinlichsten, daß dieser interessante Befund mit der abschließend diskutierten Veränderung der chromosomalen DNS unter gleichzeitigem Verlust des zellspezifischen Chromatinmusters zusammenhängt, wobei sich möglicherweise noch ein vermehrter Verbrauch von RNS infolge der in der Tumorzelle gesteigerten Neubildung von – allerdings unspezifischen – Proteinen addieren könnte.

Diese plötzliche starke Steigerung des cytoplasmatischen RNS-Gehaltes mit bzw. unmittelbar vor dem histologisch nachweisbaren Ausbruch des Carcinoms legt den Gedanken nahe, daß die Wirksamkeit des Diäthylnitrosamin auf die cytoplasmatischen Nucleoproteide trotz fortgesetzter Applikation für diese Zellen nicht mehr besteht. Vielleicht ist dies mit einer molekularen Veränderung der RNS erklärbar, die sie für weitere Alkylierungen unangreifbar macht. Ausgehend von der Vorstellung, daß die Bildung der zellspezifischen Proteine durch bestimmte, für

die einzelnen Aminosäuren charakteristische Basensequenzen der Ribosomen-RNS induziert wird, welche ihrerseits die „Information“ von der chromosomalen DNS über die Messenger-RNS erhält, ist es wahrscheinlicher, daß die Alkylierung zellunspezifische RNS-Moleküle schafft (MAGEE u. FARBER 1962), so daß einzelne Proteine nicht mehr oder nicht mehr in ihrer spezifischen Struktur gebildet werden können und die Proteinzusammensetzung der gesamten Zelle sich ändert. Der verminderte Aminosäureeinbau während der Cancerogengabe stützt die Annahme einer „gestörten“ Proteinsynthese. Mit dem Verlust zellspezifischer Proteine könnte aber auch das Enzym verlorengehen, welches die Umwandlung des Diäthylnitrosamin in die wirksame alkylierende Form katalysiert. Dies hätte die Unwirksamkeit weiterer Cancerogengaben zur Folge und würde die Tatsache erklären, daß jetzt die Zelle den verminderten RNS-Gehalt aufzufüllen vermag und die Strukturen des Ergastoplasmas wieder aufbaut (MÖLBERT, HILL u. BÜCHNER 1962).

Die immunologischen Untersuchungen von WEILER (1952, 1956, 1959), von HUGHES (1958) bestritten, neuerdings aber durch NAIRN u. Mitarb. (1960) voll bestätigt, zeigen, daß tatsächlich in experimentellen durch DAB und DAENA erzeugten Hepatomen wie auch im Plattenepithelcarcinom der Portio uteri (HILLEMANN 1962), die in der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktion der normalen Leberepithelzelle vorhandenen organspezifischen Antigeneigenschaften nicht mehr nachweisbar sind und bei der Cancerisierung progredient spezifische Proteinantigene verlorengehen.

Das könnte das Einsetzen von DNS-Synthesen in den am schwersten betroffenen Zellen der Läppchenzentren (COTÉ, OEHLERT u. BÜCHNER 1962) erklären, wenn man diesen Strukturproteinen eine sogenannte „Repressor“-Wirkung im Sinne des von BÜCHNER (1961) postulierten Reglermechanismus auf die DNS-Neubildung zugesteht. Die Tatsache, daß im „Mikrocarcinom“ und besonders im voll ausgebildeten hepatozellulären Carcinom die Zahl der ^3H -Thymidin-markierten DNS-synthetisierenden Zellen den Höchstwert von 150 $\frac{0}{00}$ erreicht (COTÉ, OEHLERT u. BÜCHNER 1962), spricht ebenfalls für die Annahme, daß die in der Carcinomzelle wieder reichlich vorhandenen Strukturproteine atypisch, das heißt zellunspezifisch sind, so daß ihre „Hemmwirkung“ auf die DNS-Synthese fortfällt, wodurch die Krebszelle ihr unbeschränktes Zellteilungsvermögen erlangen würde.

Die Veränderung (Alkylierung) der RNS führt nach diesen Vorstellungen zur Bildung eines zellunspezifischen Proteinmusters, wobei der daraus resultierende Fermentverlust die Unwirksamkeit weiterer Cance-

rogengaben erklärt, so daß die Zelle ihre cytoplasmatischen Strukturen – allerdings nicht in der normalen Proteinzusammensetzung – wieder aufbaut. Wenn das Diäthylnitrosamin aber infolge des Fermentverlustes nicht mehr zur Wirkung kommt und in der Carcinomzelle auch nach Absetzen der Substanz das Proteinmuster irreversibel verloren ist, kann die der Bildung atypischer Proteine vorausgehende entsprechende Veränderung der RNS jetzt nicht mehr auf einer fortwährenden Einwirkung der alkylierenden Substanz beruhen, ebensowenig können Proteinmoleküle direkt alkyliert werden, sondern die zur Bildung der spezifischen Proteine notwendige RNS muß bereits im Kern fehlerhaft gebildet werden. Da aber die Bildung der RNS unter Vermittlung der DNS der Chromosomen erfolgt, muß angenommen werden, daß auch an der chromosomalen DNS während der Umwandlung der Leberepithelzelle zur Krebszelle eine Veränderung erfolgt, die irreversibel ist und auch nach Absetzen des Carcinogens erhalten bleibt.

Versucht man nun unter Berücksichtigung der bisher bei der experimentellen Cancerisierung der Leberepithelzelle durch Diäthylnitrosamin und Dimethylnitrosamin erhobenen histologischen, cytologischen und autoradiographischen Befunde sich ein Bild über den möglichen Wirkungsmechanismus zu machen, der bei diesen Substanzen zu der Umwandlung der DNS und damit zur Bildung einer Krebszelle führt, so kommt man zu folgender Vorstellung:

Nach der fermentativ in der Leberepithelzelle erfolgenden Umwandlung des Dialkylnitrosamins zu einer alkylierenden Substanz bewirkt diese Veränderungen am Molekül der cytoplasmatischen RNS, die beim Dimethylnitrosamin u. a. zu einer Methylierung des Guanins zum 7-Methylguanin führt (MAGEE u. FARBER 1962). Die Veränderung der RNS mit einem entweder beschleunigten Umsatz oder einem vermehrten Abbau führt zu der Verarmung der Zelle an cytoplasmatischen Ribonucleoproteiden (HOBIG u. GRUNDMANN 1962). Daraus resultiert einmal die Abnahme der cytoplasmatischen Proteinsynthese, die sich sowohl nach Dimethylnitrosamin (MAGEE 1957, 1958; MAGEE u. VANDEKAR 1958; BROUWERS u. EMMELOT 1960; HULTIN u. Mitarb. 1960) als auch nach Diäthylnitrosamin in einem gegenüber der Norm verminderten Einbau markierter Aminosäuren in die Eiweißkörper der Zelle äußert. Darüber hinaus werden an den veränderten cytoplasmatischen Ribonucleotiden nicht nur weniger, sondern auch atypische, in ihrem molekularen Aufbau zellunspezifische Proteine gebildet; möglicherweise greift die Alkylierung zusätzlich auch noch direkt an den Proteinen an (MAGEE u. HULTIN 1962). Die Verminderung der Proteinsynthese und die Veränderungen am intakten

RNS- Molekül haben den Abbau von Strukturen des Ergastoplasmas (MÖLBERT, HILL u. BÜCHNER 1962) mit einer entsprechenden Verarmung an cytoplasmatischen Ribonucleoproteiden zur Folge. Damit entfällt die Hemmwirkung dieser cytoplasmatischen Strukturen auf die DNS-Neubildung (BÜCHNER 1961). Autoradiographisch äußert sich der Verlust der Hemmwirkung in einer vermehrten DNS-Synthese in den Zellen, die von den strukturellen Veränderungen am stärksten betroffen sind (COTÉ, OEHLERT u. BÜCHNER 1962). Gleichzeitig wird aber versucht, durch vermehrte RNS-Neubildung im Zellkern den Verlust cytoplasmatischer Ribonucleoproteide auszugleichen, was jedoch bei den in Läppchenzentren liegenden Leberepithelien nicht gelingt, wie die Ergebnisse vorliegender Untersuchungen gezeigt haben. Da zur DNS-Neubildung von der Zelle auf die RNS zurückgegriffen wird, die zum Teil als Quelle von DNS-Vorläufern, das heißt von Nucleotiden, dient (BRACHET 1950; FEINENDEGEN u. Mitarb. 1960, 1961), besteht bei den jetzt ablaufenden DNS-Neubildungen die Möglichkeit des Einbaues veränderter RNS-Nucleotide in chromosomale DNS. Dementsprechend haben MAGEE u. FARBER (1962) nach Injektion von ^{14}C -Dimethylnitrosamin ^{14}C -markiertes 7-Methylguanin auch in der DNS der Leber nachgewiesen, wobei allerdings ein direkter Angriff der Alkylierung an der chromosomalen DNS nicht auszuschließen ist. Die Wahrscheinlichkeit des Einbaues atypischer cytoplasmatischer Nucleotide in die DNS ist naturgemäß bei den Zellen am größten, die besonders stark von der Schädigung durch die alkylierende Substanz betroffen sind und in denen besonders viele DNS-Neubildungen ablaufen. Das sind nach vorliegenden und früheren Untersuchungen die Leberepithelien der Läppchenzentren, in denen dementsprechend auch das Carcinom seinen Ausgang nimmt. Unter der Voraussetzung, daß ein solcher Einbau veränderter RNS-Nucleotide in die DNS mit dem Weiterleben der Zelle vereinbar ist und zu einer zunehmenden molekularen Änderung der DNS führt, müßte man annehmen, daß an der veränderten DNS auch wieder zellunspezifische RNS reproduziert wird, wodurch weiterhin die Proteinsynthese fehlgesteuert wird und der Zelle progredient spezifische Proteine verlorengehen, wie unter anderem die Untersuchungsergebnisse von WEILER (1952, 1956, 1959) und NAIRN u. Mitarb. (1960) bestätigen, die nach DAB- und DAENA-Fütterung einen fortschreitenden Verlust leberspezifischer Proteinantigene bis zum vollständigen Verlust der gewebsspezifischen Antigeneigenschaften in der Carcinomzelle nachweisen konnten. Gleichzeitig ist aber mit der Änderung des zellspezifischen Proteinmusters in der Krebszelle auch der Verlust des Fermentes verknüpft, welches die Umwandlung des Carcinogens zur wirksamen Form kataly-

siert. Damit wird der im Carcinom trotz fortgesetzter Behandlung erfolgende Wiederaufbau der nucleoproteidhaltigen Strukturen des Cytoplasmas erklärt. Außerdem muß angenommen werden, daß die jetzt gebildeten Proteine die Hemmwirkung auf die DNS-Synthese nicht mehr besitzen, da trotz über die Norm vermehrten cytoplasmatischen Ribonucleoproteidgehaltes und gesteigerter EW-Neubildung sowie Wiederherstellung der normalen Ergastoplasmastrukturen DNS-Synthesen in schneller Folge ablaufen (COTÉ, OEHLERT u. BÜCHNER 1962). Die trotz des hohen RNS-Gehaltes im Cytoplasma der Krebszelle weiterhin maximal gesteigerte RNS-Neubildung pro Vol.-Einheit im Zellkern könnte ihre Ursache neben der gesteigerten Proteinsynthese in einer Umstrukturierung der DNS haben, wobei es zur Verschiebung zwischen euchromatischen, syntheseaktiven (HSU 1962) und heterochromatischen, inaktiven Chromosomenabschnitten mit Verlust des zellspezifischen Chromatinmusters kommen könnte. An der fertigen Carcinomzelle sind Änderungen des Heterochromatinmusters gegenüber der Norm nachgewiesen (GRUNDMANN u. STEIN 1961).

Für die Annahme, daß es sich beim Cancerisierungsprozeß um eine fortschreitende und zunehmende Veränderung an der DNS handelt, spricht auch die Tatsache, daß jede experimentelle Krebserzeugung eine bestimmte Latenzzeit benötigt und nicht mit einem Schritt die normale Parenchymzelle zur Krebszelle wird. Diese Überlegungen führen zu der Annahme, daß bereits nach dem erstmaligen Einbau eines veränderten Nucleotids in die DNS entsprechend veränderte RNS im Kern synthetisiert werden, die ihrerseits dann nach Art eines Kreislaufes bei jeder folgenden DNS-Verdoppelung immer wieder die Quelle für atypische Nucleotide bilden. Diese Annahme würde auch die Tatsache erklären, daß unter bestimmten Bedingungen eine einmalige Cancerogendosis ausreicht, um nach entsprechend langer Latenzzeit zum Ausbruch des Carcinoms zu führen, und daß Zellen, die die Fähigkeit zur DNS-Verdoppelung und zur mitotischen Teilung verloren haben, niemals Ausgangspunkt eines malignen Geschwulstwachstums werden können. Demzufolge müßte die Anzahl der ablaufenden DNS-Synthesen pro Zeiteinheit die Latenzzeit bestimmen, und es sollte eine umgekehrte Proportionalität zwischen Länge der Latenzzeit und Anzahl der DNS-Synthesen pro Zeiteinheit existieren. Anders liegen die Verhältnisse bei fortlaufender Cancerogenapplikation, da hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit immer neue und mehr cytoplasmatische RNS-Moleküle verändert werden und somit die Konzentration atypischer Nucleotide im Cytoplasma ansteigt, womit sich auch die Chance des Einbaues dieser Nucleotide während der DNS-Synthese entsprechend vergrößert.

Die letzteren Überlegungen stehen völlig im Einklang mit den tierexperimentell gewonnenen Befunden von DRUCKREY (1962), die ergaben, daß prinzipiell eine strenge Dosis-Wirkungs-Beziehung bei den verschiedensten Cancerogenen mit einer irreversiblen Summation der Einzeldosen besteht, daß aber bei protrahierter Cancerogengabe über längere Zeit der Zeitfaktor den Ausbruch des Krebswachstums im Sinne einer „Verstärkerwirkung“ (DRUCKREY 1962) schon bei einer geringeren Gesamtdosis beschleunigt.

Zusammenfassung

Während der kontinuierlichen Verfütterung von Diäthylnitrosamin bis zum Auftreten hepatozellulärer Lebercarcinome wurde bei Ratten zu verschiedenen Versuchszeiten die relative Größe der RNS- und Protein-neubildung der Leberepithelzelle autoradiographisch bestimmt. Dabei wurde als Maß für die Größe der Proteinsynthese die Inkorporationsgröße von ^3H -Leucin in Zellproteine, als Maß für die Größe der RNS-Neubildung die Inkorporationsgröße von ^3H -Cytidin in die fällbare RNS des Zellkerns genommen. Während die Proteinsynthese vor allem in läppchenzentral gelegenen Leberepithelien bis zum Beginn des Auftretens von Carcinomen gegenüber der Norm vermindert war, bestand im Zellkern sowohl zentral als auch peripher gelegener Leberepithelien eine gesteigerte RNS-Neubildung. Die größte RNS-Synthese vor dem Beginn des Krebswachstums wurde in stark vakuolisierten Leberzellen mit vergrößerten Kernen und Nucleolen in herdförmig angeordneten Zellgruppen des Läppchenzentrums gefunden. Die relative Größe der RNS-Neubildung pro Flächeneinheit des Zellkerns nahm mit fortschreitender Versuchszeit zu und erreichte im „Mikrocarcinom“ und im voll ausgebildeten hepatozellulären Carcinom die größten Werte. Während der Cancerisierung der Leberepithelzelle stand einem verringerten cytoplasmatischen RNS-Gehalt eine erheblich gesteigerte RNS-Neubildung im Zellkern gegenüber. In den Carcinomzellen waren sowohl der cytoplasmatische RNS-Gehalt als auch die RNS-Neubildung des Zellkerns gegenüber der Norm vergrößert. Die Bedeutung der erhaltenen Ergebnisse wird unter Berücksichtigung der bisher bekannten Wirkung alkylierender Substanzen besprochen. Dabei wird angenommen, daß dem Vorgang der Umwandlung der normalen Leberepithelzelle zur Krebszelle eine fortschreitende Umwandlung der zellspezifischen DNS zugrunde liegt.

Summary

Rats were fed diethylnitrosamine without a break, until the appearance of hepatocellular carcinomata, and the relative levels of RNA and

protein synthesis of hepatic epithelial cells were determined autoradiographically at different times during the experiment. The ^3H -Leucine uptake by the cell protein was used as the index of protein synthesis, while the ^3H -Cytidine uptake by the precipitable RNA fraction of the nucleus was taken as the index of RNA synthesis. When compared with normal values, protein synthesis was particularly depressed in the centrilobular epithelium up to the time the carcinoma appeared, while the RNA synthesis was raised in the nuclei of central as well as peripherally lying cells. Before the appearance of the carcinoma, RNA synthesis was most markedly raised on highly vacuolated columns of cells, with enlarged nuclei and nucleoli, at the centre of the lobule. The relative rate of RNA synthesis compared with the surface area of the nucleus rose during the experimental period, reaching its maximal values in "micro carcinomata" and fully developed growths. During carcinogenesis of the liver epithelial cell there was a reduction in the cytoplasmic RNA content which contrasted with the considerably raised level of RNA synthesis in the nucleus. In the fully formed carcinoma cells the RNA level in the cytoplasm as well as the rate of RNA synthesis in the nucleus, was raised, when compared with normal values. The implications of these findings are discussed in relation to the known actions of alkylising substances. It is assumed that a progressive conversion of the cell-specific DNA is the basis of the transformation of the normal liver epithelial cell to a cancer cell.

Résumé

Lors de l'administration continue de diéthylnitrosamine jusqu'à l'apparition des cancers hépatocellulaires, l'auteur a déterminé chez le rat à différents moments par auto-radiographie l'importance relative de la formation d'acide ribonucléinique nouveau ainsi que celle des protéines dans la cellule épithéliale du foie. Il s'est servi comme unité de mesure de l'intensité de synthèse protéinique de la ^3H -Leucine incorporée dans les protéines cellulaires et comme unité de mesure de la formation nouvelle d'acide ribonucléinique de la quantité de ^3H -Cytidine incorporée dans l'acide ribonucléinique précipitable du noyau cellulaire.

La synthèse des protéines était anormalement diminuée jusqu'à l'apparition du cancer dans l'épithélium situé au centre des lobules. Il y eut au contraire dans les noyaux cellulaires de l'épithélium hépatique (aussi bien dans celui situé au centre qu'en périphérie) une nouvelle formation accrue d'acide ribonucléinique. La synthèse la plus intense de ce dernier avant le commencement de la croissance du cancer fut trouvée

dans les cellules hépatiques fortement vacuolisées, à noyaux agrandis et à nucléoles cellulaires disposés par groupes au centre du lobule.

La taille de la néo-formation d'acide ribonucléinique — mesurée par comparaison à l'unité de surface du noyau cellulaire — augmenta avec le temps, elle atteignit son maximum dans le «micro-cancer» et dans le cancer hépato-cellulaire complètement développé. Pendant la cancérisation de la cellule de l'épithélium le taux d'acide ribonucléinique du cytoplasme était réduit, mais la formation d'acide ribonucléinique dans le noyau de la cellule accrue. Dans les cellules cancérisées le taux d'ARN du cytoplasme était augmenté comme également la formation de nouvel ARN du noyau cellulaire, qui était, lui aussi, anormalement accru. L'auteur discute l'importance des résultats obtenus en tenant compte de l'effet connu jusqu'à présent des substances alcoylisantes. — Il suppose qu'il y a à la base de la transformation de la cellule normale de l'épithélium hépatique en cellule cancéreuse une transformation progressive d'ac. désoxyribonucléinique spécifique de la cellule.

Literatur

- ALTMANN, H.-W., Über das Auftreten von Vakuolen, Einschlusskörperchen und hyalinen Tropfen in den Leberzellen bei experimentellem Sauerstoffmangel. Verh. Dtsch. Ges. Path. 1944. **1949**, 60.
- , Über Leberveränderungen bei allgemeinem Sauerstoffmangel nach Unterdruckexperimenten an Katzen. Frankf. Zschr. Path. **60**, 376 (1949).
- , Allgemeine morphologische Pathologie des Cytoplasmas. Die Pathobiosen. Hdb. Allg. Path. **II/1**, 419, (1955).
- , und OSTERLAND, U., Über cytoplasmatische Wirbelbildungen in der Leberzelle der Ratte bei chronischer Thioacetamidvergiftung. Beitr. path. Anat. **124**, 1 (1961).
- ARGUS, M. F., Carcinogenesis as related to Protein Denaturation by Nitrosamines and other watersoluble Agents. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. **3**, 206 (1961).
- ATERMAN, K., Some Local Factors in the Restoration of the Rat's Liver after Partial Hepatectomy. II. Watery Vacuolation: Its Relation to the Vacuolation of Anoxia. Arch. Path. **53**, 209 (1952).
- BENNINGHOFF, A., Funktionelle Kernschwellung und Kernschrumpfung. Anat. Nachr. **1**, 50 (1950).
- BRACHET, J., Biochemical Cytology. Acad. Press, New York **1957**.
- BROOKES, P. and LAWLEY, P. D., The reaction of mustard gas with nucleic acids in vitro and in vivo. Biochem. J. **77**, 478 (1960).
- —, The reaction of mono- and difunctional alkylating agents with nucleic acids. Biochem. J. **80**, 496 (1961).
- BROUWERS, J. A. J. and EMMELOT, P., Microsomal N-Demethylation and the Effect of the Hepatic Carcinogen Dimethylnitrosamine on Amino Acid Incorporation into the Proteins of Rat Livers and Hepatomas. Exper. Cell Res. **19**, 467 (1960).
- BÜCHNER, F., Die Morphologie der Krebsentstehung. Therapiewoche **10**, 12, 2 (1960).
- , Die experimentelle Kanzerisierung der Parenchymzelle in der Synopsis klassischer und moderner Methoden. Verh. Dtsch. Ges. Path. 45. Tagg. **37**, 1961.
- , GRUNDMANN, E. u. OEHLERT, W., Die experimentelle Cancerisierung der Parenchymzelle. Dtsch. med. Wschr. **86**, 1845 (1961).
- CARNES, W. H., BERNSTEIN, D. and RATHER, J. L., Effect of Thioacetamide on the deoxyribonucleic content of liver cells. Fed. Proc. **12**, 385 (1953).

- CASPERSSON, T., Studien über den Eiweiß-Umsatz der Zelle. *Naturwissenschaften* **29**, 33 (1941).
- COTÉ, J., OEHLERT, W. und BÜCHNER, F., Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese während der experimentellen Kanzerisierung der Leberparenchymzelle der Ratte durch Diäthylnitrosamin. *Beitr. path. Anat.* **127**, 450 (1962).
- DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., SCHMÄHL, D. und MÜLLER, M., Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen. *Naturwissenschaften* **48**, 134 (1961b).
- und SCHMÄHL, D., Quantitative Analyse der experimentellen Krebszerzeugung. *Naturwissenschaften* **49**, 217 (1962).
- EMMELOT, P. and BENEDETTI, E. L., Changes in the Fine Structure of Rat Liver brought about by Dimethylnitrosamine. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**, 393 (1960).
- FARBER, E., Carcinoma of the Liver in Rats fed Ethionine. *Arch. Path.* **62**, 445 (1956).
- FEINENDEGEN, L. E., BOND, V. P. and HUGHES, W. L., RNA Mediation in DNA Synthesis in HeLa Cells studied with Tritium labeled Cytidine and Thymidine. *Exper. Cell. Res.* **25**, 627 (1961).
- , SHREEVE, W. W. and PAINTER, R. B., RNA and DNA Metabolism in Human Tissue Culture Cells studied with tritiated Cytidine. *Exper. Cell. Res.* **19**, 443 (1960).
- FICQ, A. et BRACHET, J., Distribution de l'acide ribonucléique et incorporation de la phénylalanine-2- C^{14} dans les protéines. *Exper. Cell Res.* **11**, 135 (1956).
- FITZGERALD, P. J. and VINICHAIKUL, K., Nucleic Acid Metabolism of Pancreatic Cells as revealed by 3H -Cytidine and 3H -Thymidine. *Laborat. Invest.* **8**, 319 (1959).
- GRUNDMANN, E. u. BACH, G., Amitosen, Endomitosen und Mitosen nach partieller Hepatektomie. *Beitr. path. Anat.* **123**, 144 (1960).
- und SIEBURG, H., Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild. *Beitr. path. Anat.* **126**, 57 (1962).
- und STEIN, P., Untersuchungen über die Kernstrukturen in normalen Geweben und im Carcinom. *Beitr. path. Anat.* **125**, 54 (1961).
- , Über das organspezifische Chromatin im normalen und im carcinomatösen Parenchymzellkern. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **45**, 93 (1961).
- GUPTA, D. N., Nodular Cirrhosis and Metastasing Tumors produced in the Liver of Rats by prolonged Feeding with Thioacetamide. *J. Path. Bact.* **72**, 415 (1956).
- , Acute Changes in the Liver after Administration of Thioacetamide. *J. Path. Bact.* **72**, 183 (1956).
- HAMPERL, H., Berliner Symposium über Fragen der Carcinogenese. Akademie-Verlag, Berlin 1960.
- HEIZER, P., Desoxyribonucleic acid (DNA) contents and size of rat liver nuclei during thioacetamide intoxication and recovery. *Chromosoma (Berlin)* **7**, 281 (1955).
- HEMPEL, K., LENNARTZ, K. J. und MAURER, W., Autoradiographische Untersuchungen zum Eiweißstoffwechsel im Kern und Cytoplasma der normalen und durch Buttergelb cancerisierten Leberzelle. *Beitr. path. Anat.* **126**, 381 (1962).
- HERMAN, L. and FITZGERALD, P. J., The degenerative changes in pancreatic acinar cell caused by dl-Ethionine. *J. Cell Biol.* **12**, 277 (1962).
- HESSE, W., Untersuchungen über das Bild der vakuoligen Degeneration in der Leber am menschlichen Sektionsgut. *Beitr. path. Anat.* **107**, 173 (1942).
- HILLEMANN, H. G., Serologische und immunhistologische Untersuchungen zur Entstehung des Portiokrebses. *Zschr. Naturforsch.* **17b**, 240 (1962).
- HOBIG, H. P. and GRUNDMANN, E., Quantitative Veränderungen der DNS und der RNS in der Rattenleberzelle während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin. *Beitr. path. Anat.* **127**, 25 (1962).
- Hsu, T. C., Differential Rate in RNA-Synthesis between Euchromatin and Heterochromatin. *Exper. Cell Res.* **27**, 332 (1962).
- HUGHES, P. E., The significance of Staining Reactions of Preneoplastic Rat Liver with Fluorescein-Globulin Complexes. *Cancer Res.* **18**, 426 (1958).
- HULTIN, T., ARRHENIUS, E., LÖW, H. and MAGEE, P. N., Toxic Liver Injury. Inhibition by Dimethylnitrosamine of Incorporation of Labeled Amino Acids into Proteins of Rat-Liver Preparations in vitro. *Biochem. J.* **76**, 109 (1960).

- KETTLER, L. H., Die Leber, in: KAUFMANN, E.: Lehrbuch d. Spez. Path. Anatomie. II. Bd., 2. Teil, S. 913, 11. u. 12. Aufl. Berlin 1958.
- KLEINFELD, R. G., Early Changes in Rat Liver and Kidney Cells induced by Thioacetamide. *Cancer Res.* **17**, 954 (1957).
- and VAN HAAM, F., The Effect of Thioacetamide on Rat Liver Regeneration. I. Cytological Studies. *Cancer Res.* **19**, 769 (1959).
- LAIRD, A. K., Nuclear Changes induced in Rat Liver Cells by Thioacetamide. *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 119 (1953).
- LAWLEY, P. D. and WALLICK, C. A., The Action of Alkylating Agents on Desoxyribonucleic Acid and Guanylic Acid. *Chem. a. Ind.* **1957**, 633.
- MAGEE, P. N., Toxic Liver Injury. Inhibition of Uptake of labeled Amino Acids into Liver Protein in vivo by Dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* **65**, 31P (1957).
- , Toxic Liver Injury. Inhibition of Protein Synthesis in Rat Liver by Dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* **70**, 606 (1958).
- and FARBER, E., Toxic Liver Injury and Carcinogenesis. Methylation of Rat Liver Nucleic Acids by Dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* **83**, 114 (1962).
- and HULTIN, T., Toxic Liver Injury and Carcinogenesis. Methylation of Proteins of Rat Liver Slices by Dimethylnitrosamine in vitro. *Biochem. J.* **83**, 106 (1962).
- and VANDEKAR, M., Toxic Liver Injury. The Metabolism of Dimethylnitrosamine in vitro. *Biochem. J.* **70**, 600 (1958).
- MAURER, W., Über die Größe des Umsatzes von Organ- und Plasmaeiweiß. 10. Coll. d. Ges. für Physiol. Chemie, Mosbach 1959, S. 1. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959b.
- MAURER, W. u. PRIMBSCH, E., Größe der β -Selbstabsorption bei der ^3H -Autoradiographie. *Biochim. Biophys. Acta* 1963 (im Druck).
- MÖLBERT, E., HILL, K. und BÜCHNER, F., Die Kanzerisierung der Leberparenchymzelle durch Diäthylnitrosamin im elektronenmikroskopischen Bild. *Beitr. path. Anat.* **126**, 218 (1962).
- MÜLLER, E. und ROTTER, Wg., Über histologische Veränderungen beim akuten Höhentod. *Beitr. path. Anat.* **107**, 156 (1942).
- NAIRN, R. C., RICHMOND, H. G., Mc ENTERT, M. G. and FOTHERGILL, J. E., Immunological differences between normal and malignant cells. *Brit. Med. J.* **5**, 1335 (1960).
- and FOTHERGILL, J. E., Differences in staining of normal and malignant cells by non-immune fluorescent protein conjugates. *Brit. Med. J.* **5**, 1341 (1960).
- NIKLAS, A. und OEHLERT, W., Autoradiographische Untersuchungen der Größe des Eiweißstoffwechsels verschiedener Organe, Gewebe und Zellarten. *Beitr. path. Anat.* **116**, 92 (1956).
- OEHLERT, W., Autoradiographische Untersuchungen zur RNS-Synthese in den verschiedenen Strukturen der Zelle. *Beitr. path. Anat.* **124**, 311 (1961).
- , HÄMMERLING, W. und BÜCHNER, F., Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Desoxyribonucleinsäure-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie. *Beitr. path. Anat.* **126**, 91 (1962).
- , KRAMSCH, D. und BECK, V., Der Einfluß des Abbaues cytoplasmatischer Strukturen auf die DNS-Neubildung bei der experimentellen Äthioninvergiftung. *Naturwissenschaften* **50**, 307 (1963).
- und V. PEIN, B., Veränderungen des Eiweiß- und Ribonucleinsäure-Stoffwechsels der Epidermiszelle während der Cancerisierung und im verhornenden Plattenepithelcarcinom. *Beitr. path. Anat.* **128**, 299 (1963).
- PICHOTKA, J., Tierexperimentelle Untersuchungen zur pathologischen Histologie des akuten Höhentodes. *Beitr. path. Anat.* **107**, 117 (1942).
- POPPER, H., DE LA HUERGA, J. and YESINICK, Ch., Hepatic Tumors Due to Prolonged Ethionine Feeding. *Science* **118**, 80 (1953).
- PORTER, K. R. and BRUNI, C., An Electron Microscope Study of the Early Effects of 3'-Me-DAB on Rat Liver Cells. *Cancer Res.* **19**, 997 (1959).
- RATHER, L. I., Experimental Alterations of Nuclear and Cytoplasmic Components of Liver Cell with Thioacetamide; Early Onset and Reversibility of Volume Changes of Nucleolus, Nucleus and Cytoplasm. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **88**, 38 (1951).
- , The Significance of Nuclear Size in Physiological and Pathological Processes. *Erg. allg. Path.* **38**, 127 (1958).

- REINER, B. and ZAMENHOF, S., Studies on the Chemically Reactive Groups of Desoxyribonucleic Acids. *J. Biol. Chem.* **228**, 475 (1957).
- RONDEZ, R., RÜTTNER, J. R. und VOGEL, A., Zytologische Untersuchungen an der Thioacetamid-geschädigten Rattenleber. *Path. Microbiol.* **25**, 13 (1962).
- RÜTTNER, J. R. und RONDEZ, R., Zur formalen Genese der Thioacetamid-Zirrhose der Ratte. *Path. Microbiol.* **23**, 113 (1960).
- — und GASSMANN, R., Histochemische Untersuchungen an der toxisch geschädigten Rattenleber. *Schweiz. Zschr. Path. Bakt.* **22**, 294 (1959).
- SCHMÄHL, D., PREUSSMANN, R. und HAMPERL, H., Leberkrebserzeugende Wirkung von Diaethylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten. *Naturwissenschaften* **47**, 89 (1960).
- SCHRADER, F. and LEUCHTENBERGER, C., A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus*. *Exper. Cell Res.* **1**, 421 (1950).
- SCHULTZE, B., OEHLERT, W. und MAURER, W., Vergleichende autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -, ^{14}C - und ^{35}S -markierten Aminosäuren zur Größe des Eiweißstoffwechsels einzelner Gewebe und Zellarten bei Maus, Ratte und Kaninchen. *Beitr. path. Anat.* **122**, 406 (1960).
- — —, Über eine allgemeine Beziehung der Umsatzrate der Ribonucleinsäure und des Eiweißes im Organismus von Maus und Ratte. *Biochem. Biophys. Acta* **49**, 35 (1961).
- SCHUMACHER, H. H., Histochemie der Zellatmung bei Hypoxydase. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* **42**, 400 (1958).
- SEIFERT, G. und GIESEKING, R., Elektronenmikroskopische Befunde am Rattenpankreas nach experimenteller Äthioninschädigung. *Beitr. path. Anat.* **124**, 81 (1961).
- STÖCKER, E., Autoradiographische Untersuchungen zur Ribonucleinsäure- und Eiweiß-Synthese im nuclearen Funktionsformwechsel der exocrinen Pankreaszelle. *Zschr. Zellforsch.* **57**, 145 (1962).
- , Autoradiographische Untersuchungen zur Deutung der funktionellen Kernschwellung am exokrinen Pankreas. *Zschr. Zellforsch.* **57**, 47 (1962).
- , Die Größe des Nukleolus als Maß seiner synthetischen Aktivität. (Autoradiographischen Untersuchungen mit ^3H -Cytidin und ^3H -Phenylalanin.) *Naturwissenschaften* **50**, 44 (1963).
- THOMAS, C., Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte. *Zschr. Krebsforsch.* **64**, 224 (1961).
- WEILER, E., Die Änderung der serologischen Organspezifität beim Buttergelb-Tumor der Ratte im Vergleich zur normalen Leber. *Zschr. Naturforsch.* **7b**, 324 (1952).
- , Die Änderung der serologischen Spezifität von Leberzellen der Ratte während der Cancerogenese durch p-Dimethylaminoazobenzol. *Zschr. Naturforsch.* **11b**, 31 (1956).
- , Loss of Specific Cell Antigens in Relation to Carcinogenesis. *Ciba Foundation on Carcinogenesis. Mechanism of Action.* **165**, 1959.

LEBENS LAUF

Ich, Jörg Hartje, wurde am 16. Juli 1934 in Berlin als Sohn des Arztes Dr. Raimund Hartje und seiner Ehefrau Gisela, geb. Feltzin, geboren. Nach kriegsbedingtem häufigem Wohnorts- und Schulwechsel lebten wir seit 1947 in Idstein im Taunus, wo ich 1954 mein Abitur an der dortigen Pestalozzischule ablegte. Zum Sommersemester 1954 begann ich mein Medizinstudium in Marburg und bestand dort am 30. April 1957 das Physikum. Nach einem weiteren klinischen Semester in Marburg und an der Freien Universität Berlin, zwei Semestern in Basel und in Freiburg bestand ich dort das Medizinische Staatsexamen am 10. Oktober 1960.

Als Medizinalassistent habe ich je vier Monate in der Chirurgischen Klinik der Städtischen Krankenanstalten Darmstadt und in der Landesfrauenklinik Karlsruhe gearbeitet. Vom 1. April 1961 bis zum 31. Dezember 1962 war ich im Pathologischen Institut der Universität Freiburg, zunächst als Medizinalassistent, später als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle, tätig. Seit dem 1. Mai 1963 bin ich Medizinalassistent an der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg.

